ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 8 Fascicule 4 1987

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS



PUBLICATION TRIMESTRIELLE Décembre 1987

SOMMAIRE

Don R. REYNOLDS — A nonbitunicate ascus in the ascostromatic genus *Asterina* 251
L.M. MELENDEZ-HOWELL, A. BELLEMÈRE ET J.-L. ROSSIGNOL — Remarques à propos de l'ultrastructure d'ascospores « albinos » ou « granuleuses » de mutants d'*Ascobolus immersus* Pers. (gène b8) 269
L. NAJIM — Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* : II — Études cytologiques et ultrastructurales 289
A.I.I. ABDEL-HAFEZ, A.M.M. MOHARRAM and A.Y. ABDEL-MALLEK — Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of *Umbelliferae* from Egypt 315
G. MORENO, C. ILLANA and M. HEYKOOP — *Gastrocybe iberica* sp. nov. in Spain (Bolbitiaceae, Agaricales) 321
Analyses bibliographiques 329
Table du Tome 8 — 1987 335

CONTENTS

Don R. REYNOLDS — A nonbitunicate ascus in the ascostromatic genus *Asterina* 251
L. M. MELENDEZ-HOWELL, A. BELLEMÈRE et J.-L. ROSSIGNOL — Remarks concerning the ultrastructure of ascospore mutants « albino » and « granular » in *Ascobolus immersus* Pers. (b8 gene). (in French) .. 269
L. NAJIM — Morphogenetic control of sclerotia differentiation of *Sclerotinia fructigena* : II — Cytological and ultrastructural studies. (in French) 289
A.I.I. ABDEL-HAFEZ, A.M.M. MOHARRAM and A.Y. ABDEL-MALLEK — Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of *Umbelliferae* from Egypt 315
G. MORENO, C. ILLANA and M. HEYKOOP — *Gastrocybe iberica* sp. nov. in Spain (Bolbitiaceae, Agaricales) 321
Reviews 329
Table of Volume 8 — 1987 335

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 8 Fascicule 4 1987

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts, Current Contents,* Publications bibliographiques du CDST (Pascal).





A NONBITUNICATE ASCUS IN THE ASCOSTROMATIC GENUS *ASTERINA*

by Don R. REYNOLDS*

ABSTRACT — The ascus of *Asterina carbonacea* Cooke is nonbitunicate and is formed in an ascostroma. There is a similarity with the eu-archaeascé ascus type. A comparison of this ascus type with the bitunicate ascus demonstrates a difference in the wall structure and the origin of the extended wall formed during spore ejaculation. The primary ascus wall stains blue with IKI and Sudan Black B ; pretreatment with KOH before IKI results in a nonstaining primary wall and blue-staining of the secondary wall. The banded pattern of the secondary wall is recognizable as Couche D1 and Couche D2. Couche D2 extends in ascospore dispersal from an apically positioned dome-shaped wall component into a tube reaching to the surface of the ascocarp. None of the ascus wall layers separate during spore dispersal. This study indicates that the family Asterinaceae should be recognized as a taxon apart from those included in the loculoascomycetes.

RÉSUMÉ — L'asque d'*Asterina carbonacea* Cooke est non-bituniqué et est formé dans un ascostroma. Il présente une similitude avec le type eu-archaeascé. La comparaison avec l'asque bituniqué montre une différence dans la structure de la paroi et dans l'origine de celle qui se forme, par extension, pour l'éjection des spores. La paroi primaire de l'asque se colore en bleu avec l'IKI et le noir Soudan B ; un prétraitement par KOH avant l'IKI ne donne pas de coloration de la paroi primaire, mais une coloration bleue de la paroi secondaire. On peut reconnaître les couches D1 et D2 dans la paroi secondaire. Lors de la dispersion des ascopores, la couche D2 s'allonge, à partit d'une zone apicale en forme de dôme, en un tube qui rejoint la surface de l'ascocarpe. Aucune des couches de la paroi ascale ne se sépare pendant les processus d'éjection des spores. Cette étude indique que la famille des Asterinaceae doit être reconnue comme un taxon particulier parmi les loculo-ascomycètes.

KEY WORDS : *Asterina*, ascostromatic ascomycete, ascus.

* Natural History Museum, 900 Exposition Boulevard, Los Angeles, California 90007 USA.

INTRODUCTION

The ascus has a wide variance in structure (SHERWOOD, 1981 ; ERIKSSON, 1981). HAWKSWORTH & al. (1983) noted that the recognition of only the bitunicate, prototunicate, and unitunicate major ascus types in the last decade is too simplistic an approach to ascus characterization.

The development of an *Asterina* species was shown by WARD (1882) to be ascostromatic in that the ascocarp developed before the origination of asci from an included hyphal system that formed a « boss or raised disc ». The asci were illustrated as uniformly thin-walled.

The ascus of *Asterina melastomatis* Léveillé was illustrated by ARNAUD (1918) as having a thickened apical region with the tube-shaped extension of the protoplast ; ascospores were shown reaching the outer surface of the ascocarp hymenium in linear form from an extended thin-walled cupulate enclosure that appears to be intended as the expended ascus. The asci of *Asterina mulleri* Stevenson (STEVENSON, 1943) and *A. solanacearum* Orejuela (OREJUELA, 1944) were described as « evanescent ».

The family of the species studied here, the Asterinaceae Hansford, has been described as having a « probably semifissitunicate » or « rostrum-like » jack-in-the-box ascus (ERIKSSON, 1981). ERIKSSON (1981) described the rostrate type of ascus as having a wall that is « reverted and extruded as a rostrum ». The semifissitunicate type of ascus was described as having a « reverted » inner wall which extended as a « rather long rostrum ».

The Asterinaceae ascus characterization was composed by ERIKSSON (1981) from a description of the ascus of the assumed type species of the family type genus ; « type species not indicated, but commonly cited as *A. melastomatis* Léveillé ». The material studied was not the type material from Brasil (LÉVEILLÉ, 1845), but rather Guatemalan material collected in 1907 and distributed as # 1749 in Rehm's ascomycete exsiccatum. The inner wall was said to be distinct and staining IKI + blue and Congo Red + as minute granules on the ascus surface. The inner wall was described as a layered, up to approximately 6 µm thick, « apical dome » which showed an « ocular chamber » and a Cobolt Blue + meniscus.

The ascus of the asterinaceous *Placoasterella baileyi* (Berkeley & Broome) Arx was examined with electron microscopic resolution by TYSON & GRIFFITHS (1976b). They found the banded pattern secondary wall and compared the structure to that found by REYNOLDS (1971). The ascus was observed to undergo an elongation of the secondary wall prior to losing a basal attachment in the ascocarp. The entire ascus and the contained ascospores of this species were found to be discharged from the ascocarp with separation of the wall into two layers ; no actual ascospore discharge was seen by these authors, but a « mechanism involving the dissolution of the thin ascospore-enclosing sheath, and the passive release of ascospores » was suggested. ERIKSSON (1981) pronounced the dehiscence of the ascus of *P. baileyi* as « pseudofissitunicate » after the false Jack-in-the-Box ascus of PARGUEY-LEDUC & CHADEFAUD (1963) ; the ascospores are extruded in the uppermost part of the epiplast with the surrounding plasmalemma in this mode of dehiscence.

MATERIALS AND METHODS

The ascus used in this study is that of *Asterina carbonacea* Cooke.

The material used in this study is curated in Herbarium LAM as # 300451. The collection was made by Allen G. SHUEY from a cypress swamp located 1 mile west of US Highway 441/17-92 and 4.5 miles north of the Orange-Osceola county line, between Kissimmee and Orlando, Florida, Section 16, Township 24S, Range 29E, on 5 February 1980. The fungus was growing on the surface of the leaves of the swamp red bay, *Persea palustris* (Raf.) Sarg.

Light microscope observations were made with a Zeiss dissection microscope and a Nikon compound microscope. Whole and squash mounts and handcut cross sections were made of the ascocarps. The hymenial layer was dissected from KOH pretreated ascocarps. Final mounts for observations were made in lactophenol. Cytochemical tests were made according to the protocol of ERIKSSON (1981) and BARAL (1987).

Transmission electron microscope observations were made with a JOEL 100 CXII electron microscope at 80 KV. Fruit bodies were teased off the surface of a leaf into a 3% KOH solution and allowed to soak for approximately ten minutes. The material was then fixed in 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde mixed with a 0.1 M cacodylate buffer containing 0.02% CaCl2. The material was rinsed with the buffer after 24 hours in the fixative, and then rinsed with 30% ethanol. The ascocarps were soaked in 50% ETOH containing 0.5% uranyl acetate for 12 hours. Dehydration was carried out in a series of 80%, 95%, and 100% ETOH and in 100% propylene oxide. The infiltration of the embedding material began in a 12-hour soak in a 50/50 ratio of propylene oxide and Spurr's medium. Final embedding was carried out in the medium-hard formula of the Spurr's epoxy. A Sorvall MT2-B ultramicrotome equipped with a diamond knife was used to produce approximate 0.75 mm thick sections for review with the light microscope and approximate 800 angstrom sections for TEM viewing. Staining of the thin sections was done with an aqueous saturated solution of uranyl acetate, followed by the lead citrate stain. Scanning electron microscope observations were made with a Cambridge S4-10. Dried leaf specimens with fruit bodies were coated with gold-platinum in a sputterer coater.

RESULTS

The life cycle (Fig. 1) begins with the germination of the two-celled ascospore (Figs. 1 A-B) on the leaf surface. An initial hypha is formed in usually the apical area of one ascospore cell (Fig. 1 B) ; branching is apparent after the formation of only a few cells (Fig. 1 C). The hyphopodia begin to appear soon thereafter (Fig. 1 D).

The ascocarp is comprised of a pair of hyphal systems which make up what is essentially a fruitbody with indeterminate growth. The ascocarp originates, apparently at random, from a hyphal cell of the darkly pigmented foliicolous mycelium (Figs. 1 E, 2 A). Resultant growth progresses in a plane parallel to the substrate surface. Divisions of the first and a few subsequent cells initiate prescribed meristematic activity. The first cells are somewhat irregularly arranged as a flattened mass (Fig. 1 F). A peripheral meristematic zone is established by cell division in

cohesive hyphal tips (Figs. 1 G-I). The lead cell of each component hyphal strand gives rise to one to several cells which diverge regularly into the upper hyphal system and irregularly into a lower hyphal system.

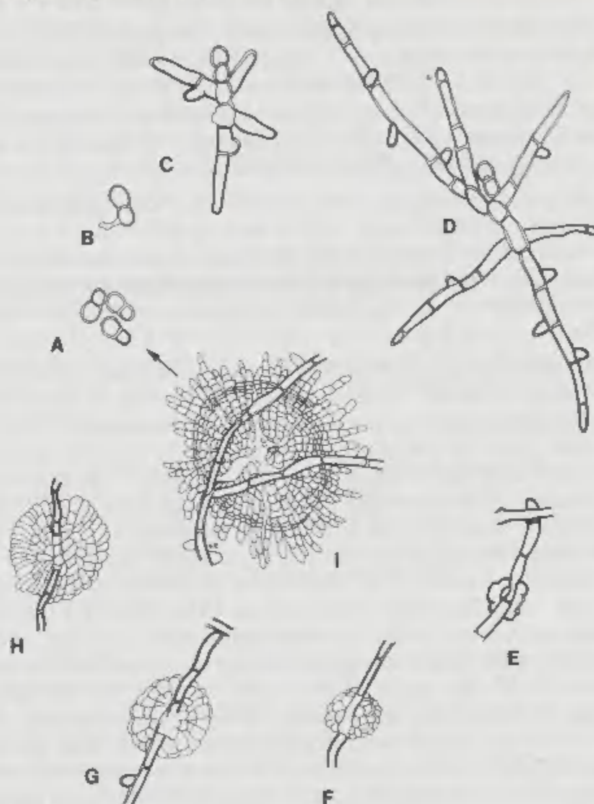
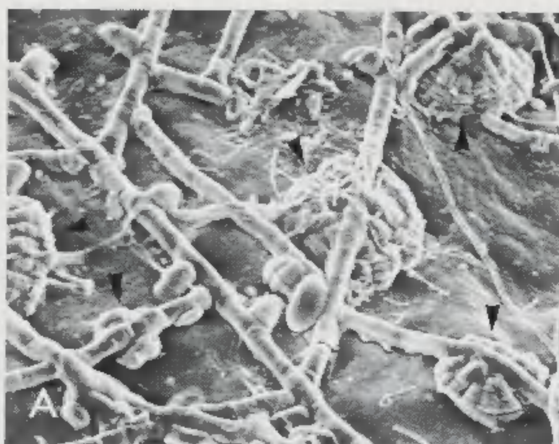


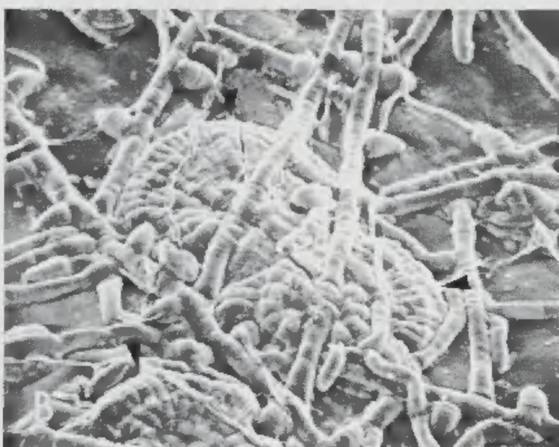
Fig. 1 — *Asterina carbonacea* Cooke. Life history. A. Three bicelled ascospores. B. Ascospore with germ tube. C. Initial hypha of young mycelium with three branches. D. A more advanced mycelium with hyphopodia on some component hypha. E. Hypohyphal growth preliminary to ascocarp formation. F. Young ascocarp initial. G-H. More advanced ascocarp stages with radiate pattern of upper hyphal system layer evident. I. Mature ascocarp with ruptured upper layer and continued growth of individual hyphal strands at the ascocarp edge.

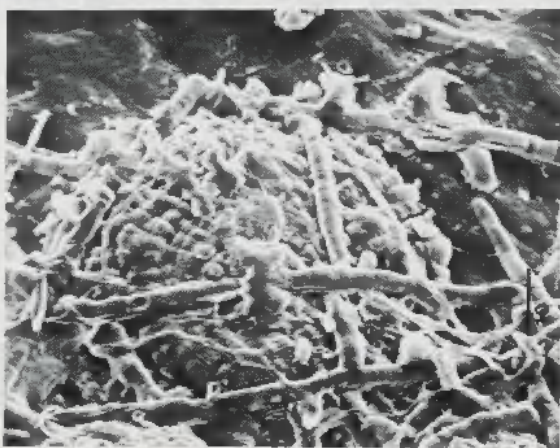
Fig. 1 — Cycle d'*Asterina carbonacea* Cooke. A. Trois ascospores bicellulaires. B. Ascospore avec tube germinatif. C. Hyphes initiales de mycélium jeune avec 3 ramifications. D. Mycélium plus âgé avec des hyphopodes sur quelques hyphes. E. Croissance hypohyphale précédant la formation de l'ascocarpe. F. Début d'un ascocarpe. G-H. Stades d'ascocarpes plus avancés montrant l'orientation rayonnante de la couche hyphale supérieure. I. Ascocarpe mûr montrant une rupture de la couche supérieure et la croissance continue des hyphes individuelles sur les bords.

Fig. 2 — *Asterina carbonacea* Cooke. Views of the ascocarp (S.E.M.). A. Four ascocarps (arrows) in the initial stages of formation from beneath the hyphal strand of origin. B. Ascocarps (arrows) at a more advanced stage with the radial pattern of upper hyphal system layer evident. C. Mature ascocarp with intact upper hyphal system layer. Note the hyphopodiate hyphae traversing the leaf surface and the ascocarp surface as well.

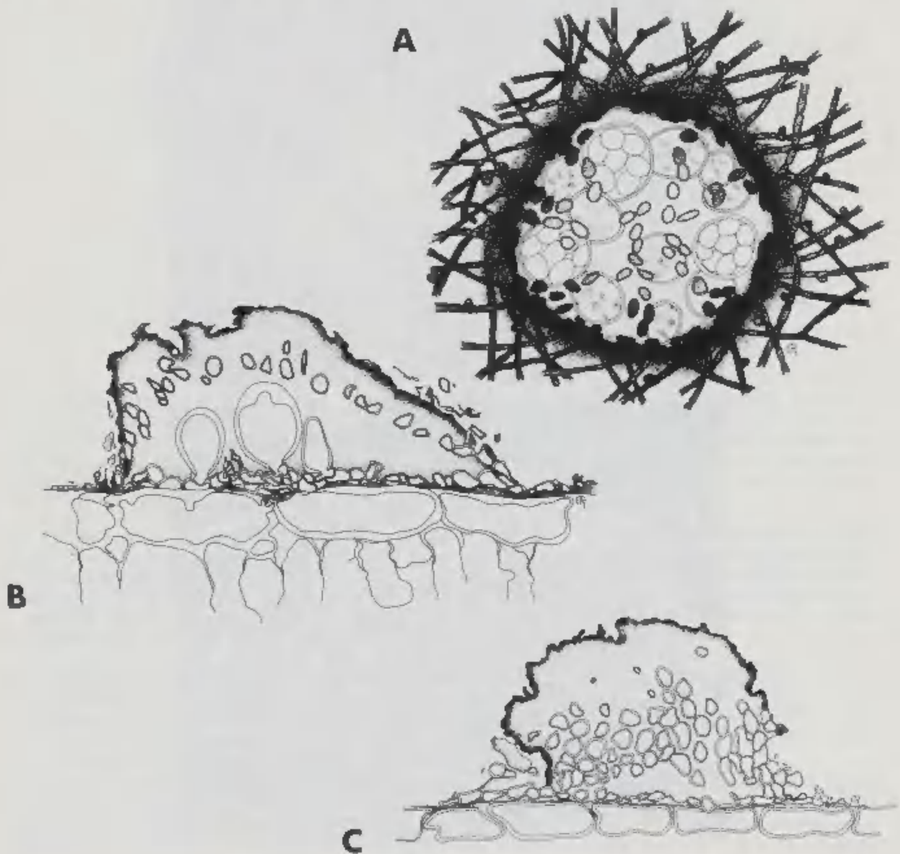
Fig. 2 — Ascocarpe d'*Asterina carbonacea* Cooke (M.E.B.). A. Premiers stades de formation de 4 ascocarpes (flèches) sous les hyphes initiales. B. Ascocarpes (flèches) à un stade plus avancé montrant l'orientation rayonnante de la couche hyphale supérieure. C. Ascocarpe mûr montrant une couche hyphale supérieure intacte. Noter l'hyphe hyphopodiale traversant la surface de la feuille et celle de l'ascocarpe.


A





An unmagnified dorsal view of the upper hyphal system shows a small, rounded, black growth on the surface of a leaf. Low magnification demonstrates the radial pattern of the component darkly pigmented hyphae which branch at more-or-less regular intervals so that a tissue-like confluence is maintained with increasing diameter of the fruitbody (Figs. 1 H-I, 2 B-C). The synchronized division results in a concentric pattern of surface ridges (Fig. 2). The upper layer maintains its integrity until the pressure from the contained maturing asci, beginning their discharge, causes it to break into deciduous segments in larger-sized fruit bodies (Fig. 1 I). Separations between hyphal strands occur at several points in the central older portion of the ascoma and radiate outward toward the ascocarp edge. The resultant stellate pattern of the split, pigmented, upper hyphal system is visually enhanced because of the exposed underlying non-pigmented lower hyphal system. The angular flaps of pigmented hyphae initially remain intact as additional peripheral meristematic activity and a corresponding maturing of the central area hymenium occur. Further disintegration of the stellately fractured upper layer into small bits of tissue is usually associated with the older ascocarp. Both mature asci and developing asci become apically exposed with only a few hyphal strands running over the surface of the ascocarp (Fig. 3 A-B). At this stage vertically oriented portions of the upper layer remain near the outer ascocarp edge (Fig. 3 C).



The lower hyphal system is the source of the asci and of secreted gelatineous material. This system is first apparent when the upper hyphal system reaches a diameter in the range of 300 μm (Fig. 4). Copious production of a hygroscopic mucin coincides with the formation of primary branches directly from the peripheral meristem zone at irregular intervals. Toluidine blue staining of thin sections and of squash mounts results in a metachromatic reaction of the gel ; it becomes an intense purple to light lavender. The non-pigmented hyphae of the lower hyphal system ultimately form a loose mycelial network under the overlying upper hyphal system. Secondary branches develop from outgrowths of the primary hyphal cell at close intervals.

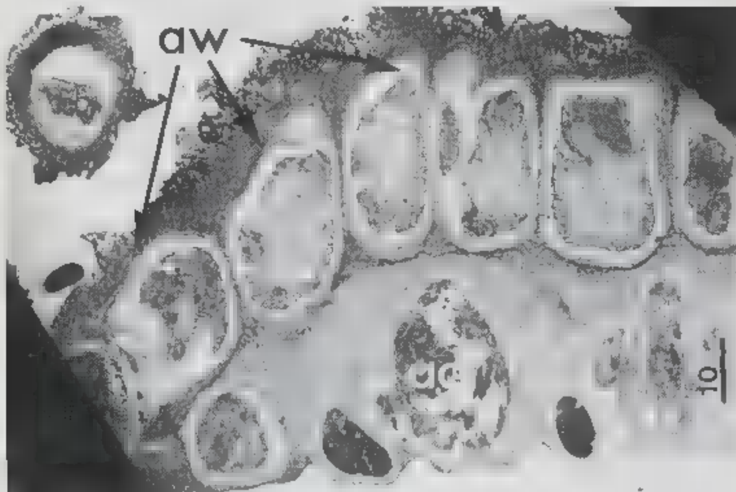


Fig. 4 — *Asterina carbonacea* Cooke. Longitudinal section through the ascocarp (T.E.M.). The upper hyphal system forms the shield shaped ascocarp wall (aw). The ascus initials (ac) originate from the lower hyphal system. A layer of gelatinous material pervades the entire ascocarp.

Fig. 4 — Coupe longitudinale de l'ascocarpe d'*Asterina carbonacea* Cooke (M.E.T.). Le système hyphal supérieur forme la paroi de l'ascocarpe en forme de bouclier (aw). Les initiales des asques (ac) se forment à partir du système hyphal inférieur. Une couche de matériel gélatineux occupe l'ascocarpe tout entier.

Fig. 3 — Schémas de l'ascocarpe d'*Asterina carbonacea* Cooke. Vue apicale montrant que le réseau hyphal supérieur du bouclier est désagrégé à l'exception de quelques cellules restant à la surface d'une matrice gélatineuse. On voit des asques immatures et des asques contenant les ascospores. B. Coupe longitudinale au milieu d'un ascocarpe mûr à la surface d'une feuille. Le réseau hyphal supérieur formant le bouclier et le réseau hyphal inférieur ascogène sont immergés dans une matrice gélatineuse. C. Coupe longitudinale sur les bords d'un ascocarpe mûr. Le système hyphal supérieur est orienté verticalement sur les bords de la masse hyméniale.

Fig. 3 — *Asterina carbonacea* Cooke. Diagramatic views of the ascocarp. A. Aerial view of the upper hyphal system forming the shield has disintegrated except for a few cells remaining on the surface of the inapparent gelatineous matrix. Both immature asci and asci with ascospores are illustrated. B. Longitudinal midsection through mature ascocarp on leaf surface. The upper hyphal system forming the shield and the lower hyphal system forming the ascogenous system are immersed in a gelatineous matrix. C. Longitudinal section through mature ascocarp at its edge. The upper hyphal system is vertically oriented at the edge of the contained hymenial area.

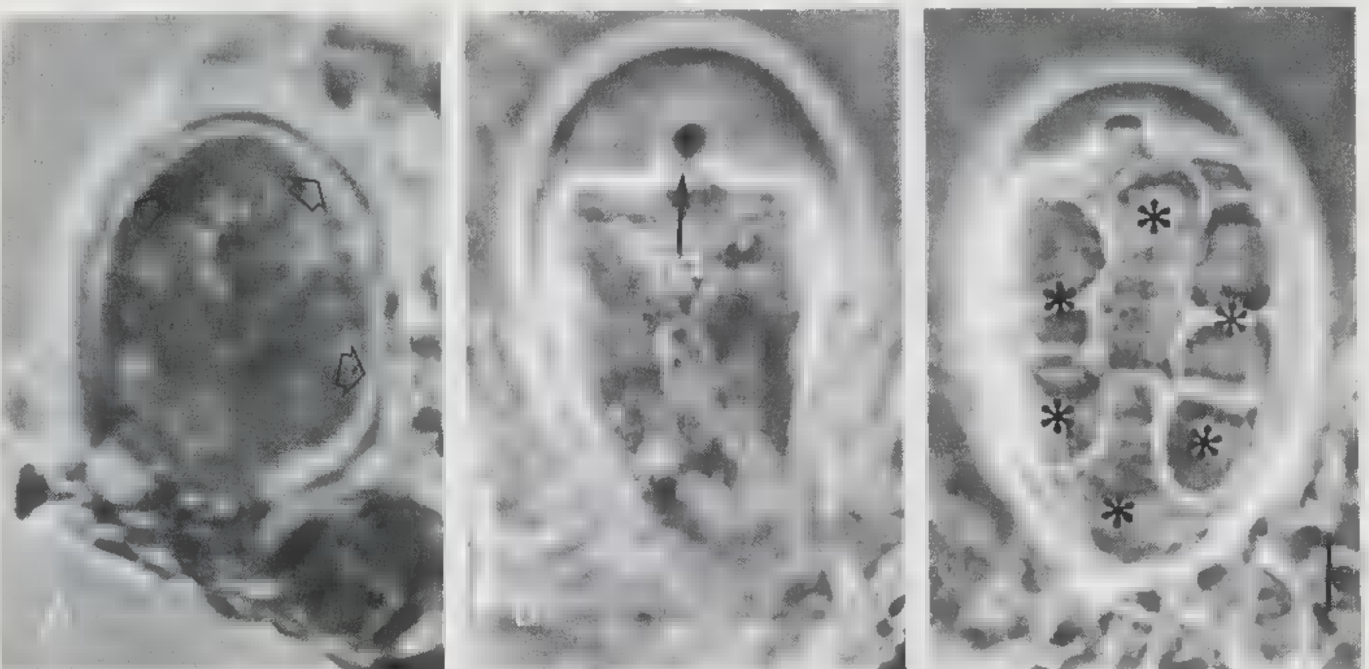


Fig. 5. — *Asterina carbonacea* Cooke. Ascus in light microscope view. A. Young ascus cell in initial growth stage. Arrows indicate primary wall. B. Preascosporogenesis ascus with mature wall (na = apical chamber, site of the nasse apicale). C. Mature ascus with bicelled ascospores (*).

Fig. 5 — Asque d'*Asterina carbonacea* Cooke en microscopie optique. A. Jeune cellule initiale d'asque. Les flèches indiquent la paroi primaire. B. Phase préascosporogène d'un asque à paroi mûre (na = chambre apicale, site de la nasse apicale). C. Asque mûr avec des ascospores bicellulaires (*).

The sympodially produced asci originate at irregular intervals from the secondary branches. The ascus initial cell enlarges somewhat in width, but mostly in length. Growth in the initial stages is accompanied by the deposition of wall material in an encompassing primary layer (Fig. 5 A). A single nucleus can be demonstrated in the cell at this stage with phase microscopy in both recently collected and KOH reconstituted dried material.

The formation of the secondary ascus wall is apparent when the ascus initial cell reaches a height of 60-70 μm (Fig. 5 B). This material forms an apical dome in the apex of the ascus which has a conspicuous extension of the protoplast into its center (Figs. 5 B-C). The longitudinally oriented striae of the nasse apicale can be demonstrated with the light microscope as was done previously (REYNOLDS, 1971). The striae are somewhat difficult to see with the ascus in midfocus in lactophenol but are discernable when the ascus is stained with IKI, both with and without KOH pretreatment. They also become better seen with a slight distortion of the ascus apex in a microscope mount ; the striae are more prevalent in the ascus with formed ascospores and before pigmentation develops in the ascospore wall.

A single nucleus can be demonstrated in the cell at this stage with phase microscopy. The ascus undergoes a change in its shape during ascosporogenesis resulting in a different morphology of the secondary wall material in the ascus apex and in the overall outline of the ascus (Figs. 5 B-C).

The primary ascus wall, illuminated as a heavy line in Figs. 9 C-D, stains blue in Sudan Black B. The results with dilute and strong solutions of IKI and Meltzer's solution are given in Table 1.

The use of the term « couche » to interpret the ascus wall introduced by BELLEMÈRE (1971) can be used to label the layers of the mature ascus wall. A comparison of the ascus in mid- or near midsection with a tangential section is made in order to give additional characterization to each Couche.

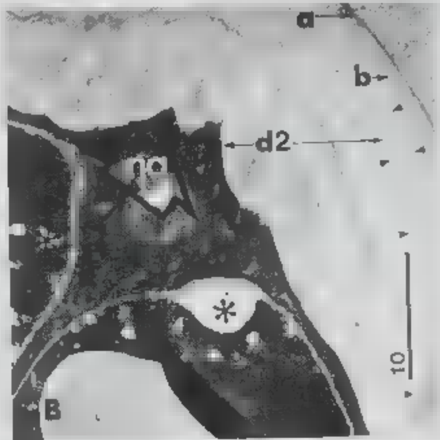
The encompassing primary wall is comprised of two layers seen and can be identified in the mature ascus as comprising Couches A and B (Fig. 6). Couche A is a densely staining external layer ; Couche B consists of a wall matrix with the same, but less dense, parallel-to-the-surface orientation of the wall components.

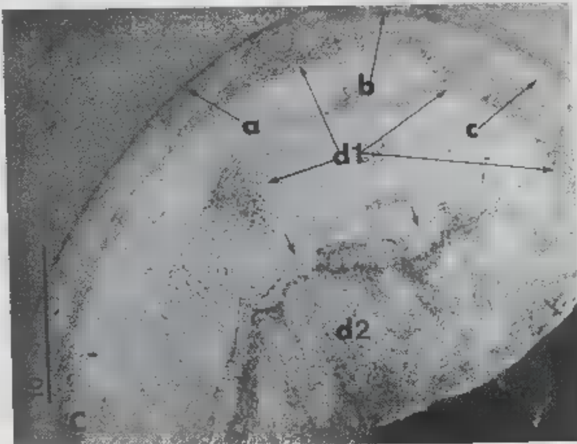
REACTIVE ASCUS WALL COMPONENT	IODINE TREATMENT			
	No Pretreatment		Pretreatment	
	IKI	Meltzer's	IKI	Meltzer's
Primary ascus wall	BB	b	---	---
Secondary ascus wall				
Dome	---	---	1b	1b
Inner surface	---	---	b	b

Table 1 — Amyloidity in the ascus of *Asterina carbonacea* Cooke. Protocol followed was that of Baral (1987). The color resulting from the application of iodine in IKI and Meltzer's solutions and with and without pretreatment of the ascus with KOH are tabulated (BB = blue in high and low iodine concentration ; - - - = no reaction ; b = blue ; 1b = light blue).

Tableau 1 — Réaction amyloïde de l'asque d'*Asterina carbonacea* Cooke. Tableau des colorations obtenues par les solutions d'iode dans l'IKI et de Meltzer, avec ou sans prétraitement de l'asque par KOH (protocole selon Baral, 1987 ; BB = bleu pour des concentrations en iode élevées et faibles ; - - - = aucune réaction ; b = bleu ; 1b = bleu clair).


g
aw
A
10


a
b
d2
*
10
B


b
a
c
d1
d2
10
C

The formation of the two-layered secondary ascus wall begins with the deposition of Couches C and D. Couche C is apparent as a zone between Couche B and Couche D, recognizable by an abrupt difference in the microfibrillar distribution pattern.

There are two regions of Couche D which are visible with the resolution of the electron microscope (Figs. 6-7) but not with the light microscope (Fig. 5). The Couche D layers are fully deposited prior to ascosporogenesis. Couche D1 is peripherally deposited on the inner surface of Couche C.

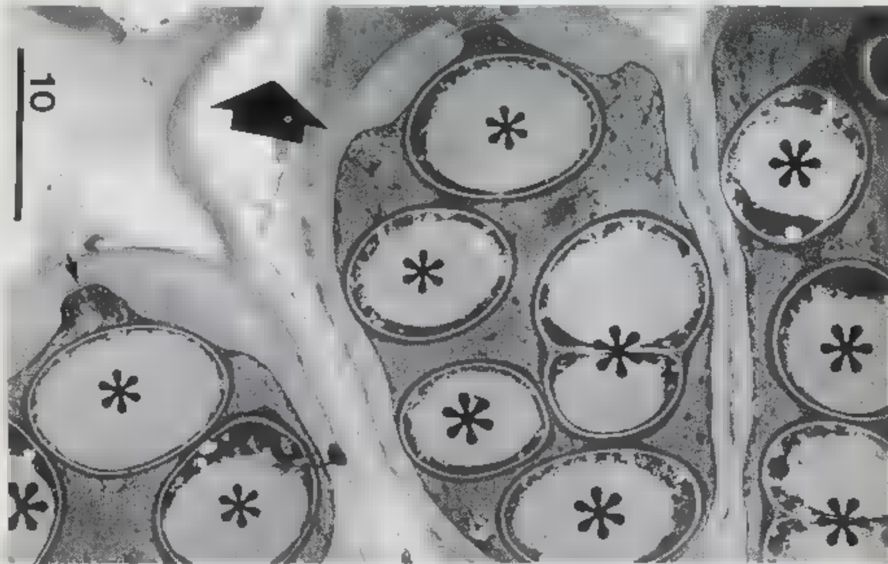


Fig. 7 — *Asterina carbonacea* Cooke. Asci (T.E.M.). Three mature asci with one or two cells of the bicellular ascospores (*) and the apical chamber (small arrows). A discharged ascus (large arrow pointing in the direction of the ascospore expulsion) can be identified in this hymenial section.

Fig. 7 — Asques d'*Asterina carbonacea* Cooke (M.E.T.). Trois asques mûrs contenant les ascospores bicellulaires (*) et la chambre apicale (petites flèches). Un asque vidé (large flèche pointée dans la direction de l'expulsion des ascospores) est visible sur cette coupe de l'hyménium.

Fig. 6 — *Asterina carbonacea* Cooke. Longitudinal sections in slightly off-center views (T.E.M.) A. View of tip of ascocarp near wall (aw), showing the tip of an ascus with a mature wall which contains two immature ascospores (*). Note the gelatineous matrix (g) surrounding the ascus. The arrows indicate the stress zone just above the tangential view of the nasse apicale which is formed during ascosporogenesis as the ascus accommodates the developing ascospores. B. An enlarged section of A. Couche A (a) and Couche B (b) are the outermost layers, with Couche C not well demonstrated. Couche D1 (d1) is indicated in the area outlined by the small stemless arrows with Couche D2 (d2) evident by the banded layers. The immature ascospores (*) lack walls. C. Oblique tangential section through ascus apex. Couches A-D (a, b, c, d) are demonstrable. Stressed layer created by wall reorientation during ascospore formation is seen in a lateral region above Couche D2 (small arrows).

Fig. 6 — Coupes longitudinales d'asques d'*Asterina carbonacea* Cooke (M.E.T.). A. Sommet de l'ascocarpe près de la paroi (aw), montrant l'apex de l'asque avec une paroi mûre qui entoure 2 ascospores immatures (*). Noter la matrice gélatineuse (g) entourant l'asque. Les flèches indiquent la zone de scission juste au-dessus de la nasse apicale (vue tangentielle) qui est formée pendant l'ascosporogenèse. B. Détail de A. La couche A (a) et la couche B (b) sont les couches extrêmes, la couche C est peu distincte. La couche D1 (d1) est la zone définie par les têtes de flèches et la couche D2 (d2) montre différentes strates. Les ascospores immatures (*) n'ont pas de paroi. C. Coupe tangentielle oblique dans l'apex de l'asque où l'on peut voir les couches A à D (a, b, c, d). La zone de scission créée par la réorientation de la paroi au cours de la formation des ascospores est située dans la région latérale au-dessus de la couche D2 (petites flèches).

Couche D1 has the banded pattern of the bitunicate endotunica (REYNOLDS, 1971). Dark-staining microfibrils are embedded in the amorphous wall matrix with an orientation that is generally horizontal to the protoplast surface. Additionally, the embedded microfibrils form a reoccurring pattern of verticle bands. The peaks and valleys of undulations in the wall give definition to the band boundaries. Couche D1 forms a slight bulge (Fig. 6) at the lower edge of the Couche D2 dome and becomes thinner toward the ascus apex.

Couche D2 is deposited last and is found in the upper third of the ascus as a dome-shaped layer (Fig. 6). The microfibrillar deposition pattern of Couche D2 in asci with developing or mature ascospores has lines that run across and perpendicular to the vertical band zones (Figs. 6 A-B, 7). These lines have a discernibly different arching angle in the preascosporogenic and the post ascosporogenic ascus. There is a noticeable density in these lines immediately over the nasse apicale. These lines appear to be « stretch marks » formed during ascosporogenesis as a result of the stress in the wall layers induced during the accommodation of the developing ascospores.

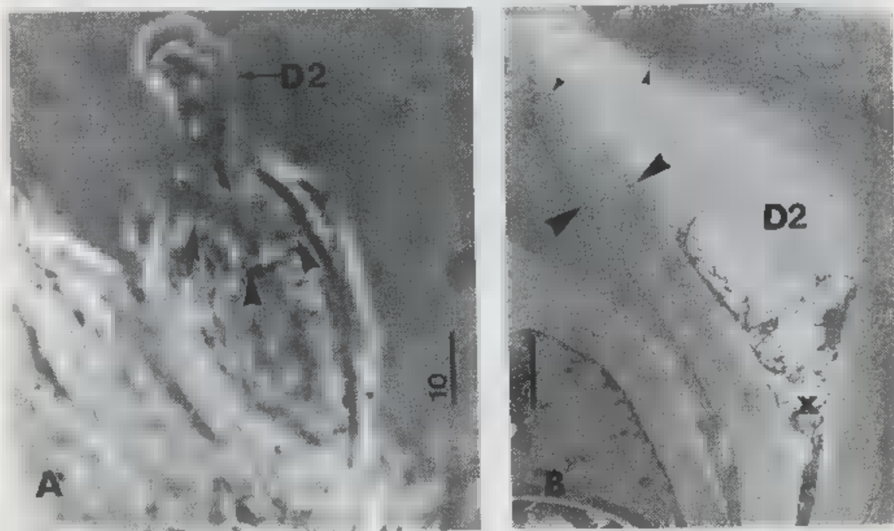


Fig. 8 – *Asterina carbonacea* Cooke. Comparative light and electron microscopic views of discharged asci. A. Ascus with wall extended beyond disrupted wall (arrows) (light microscope). This view demonstrates the possibility that the ascus can be interpreted as bitunicate at this resolution. As discerned from Fig. B, Couche D2 (D2) extends beyond the remaining portion of the wall (arrows). B. View similar to A of the ascus discharge apparatus with the resolution of the transmission electron microscope. The ascus breaks (small arrows) to allow an extension of the ascus wall which is formed from Couche D2. Couche D2 remains unseparated from the Couches A-D1 portion of the ascus wall (indicated between large arrows).

Fig. 8 – *Asterina carbonacea* Cooke. Comparaison des clichés de microscopie optique et électronique d'asques vidés. A. Asque montrant une paroi étirée au-dessus de la paroi déchirée (flèches) (microscopie optique). Ce cliché montre que l'asque peut être interprété comme bituniqué à ce grandissement. Comme on peut le voir sur la Fig. B, la Couche D2 (D2) s'étend au-delà des restes de la paroi (flèches). B. Vue correspondant à la Fig. A, avec la résolution du microscope électronique à transmission. L'asque s'ouvre (petites flèches) pour permettre une extension de la paroi ascale, formée à partir de la couche D2. La Couche D2 reste liée aux Couches A-D1 de la paroi ascale (portion indiquée entre les grandes flèches).

An apical extension of the protoplast is maintained from the beginning of the Couche D2 wall deposition (Figs. 5-9). The usual position of the apical extension is in a line on the approximate axis of the ascus. The structural integrity of the ascus apex extension and the Couche D2 socket into which it fits can be demonstrated in squash mounts in which the protoplast is mechanically separated from the ascus cell wall. Occasionnally a slight separation occurs immediately above the ascus apex extension, forming a spacial artifact.

The inner-wall surface interface with the apical cytoplasmic extension is undulate as a result of the underlying surface configuration of the banded pattern Couche D1. This feature can be identified with a through-focus examination which demonstrates an overlapping array of curving focus-planes formed by the band boundaries. The spiral rods formed from the optical properties of the protoplast inner-wall surface can be seen in some microscope preparations.

Ascosporogenesis occurs after the formation of the ascus wall is completed. Most of the asci are eight-spored, allhrough some were seen to have only four pigmented ascospores. The ascus shape changes as the ascospore initials are formed, presumably during meiosis and especially during the latter stages when the ascospore wall is deposited.

With the formation of the ascospores, the ascus assumes a more rounded shape. During this stage, the Couche D layers undergo further modification as the ascus stretches to accommodate the developing ascospores (Figs. 5 B-C, 6). At ascospore release, the outer wall layer splits (Figs. 8, 9). The Couche D2 layer extends as a tube.

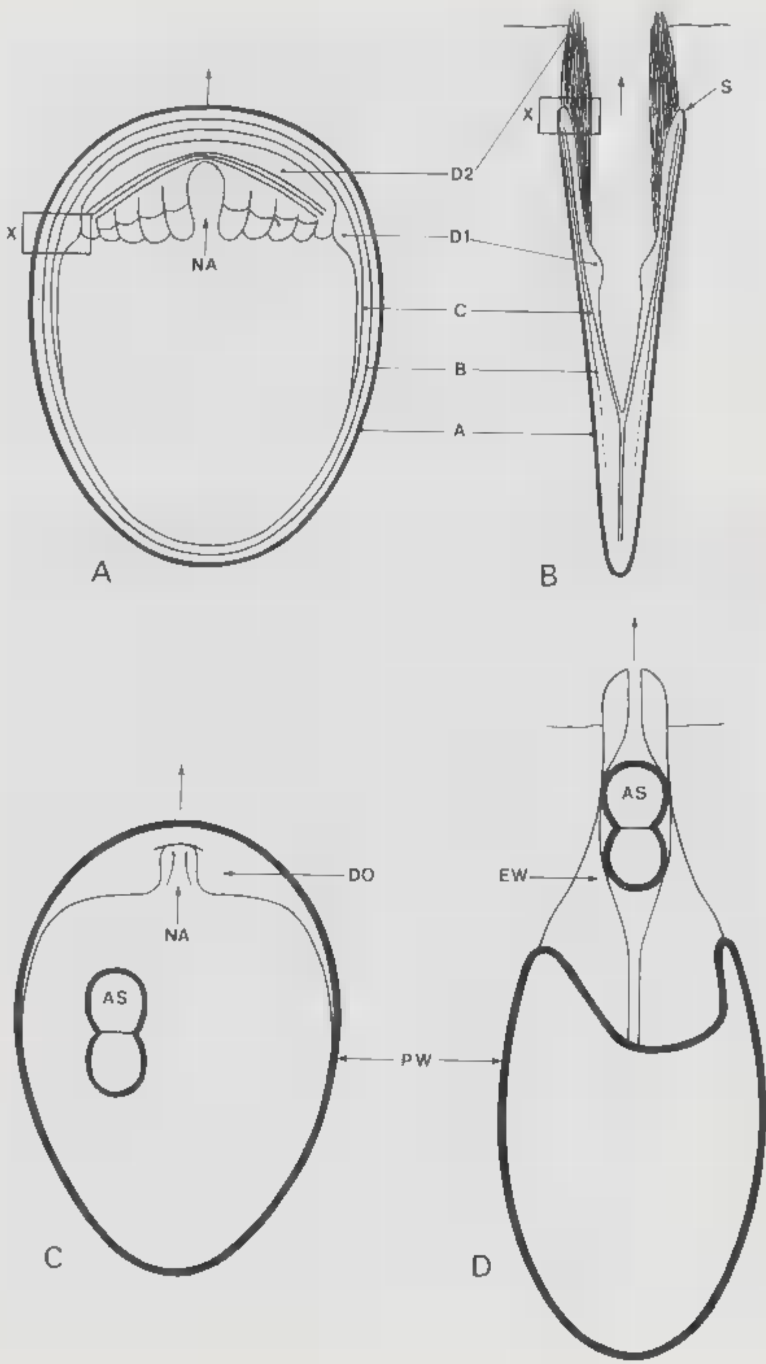
Contrary to the impression gained from light microscopic viewing (Fig. 8 A), there is no separation of the Couche D2 layer from the other wall layers (Figs. 8 B, 9). The orientation of the microfibrils in the wall matrix after ascospore ejaculation indicate no upward displacement from the original interface of Couche D1 and Couche D2 (Fig. 8 B).

The ascospores leave the ascus in single-chain formation (Fig. 9 D) and exit the extended wall via the unmodified, open apical end of the surrounding tube (Figs. 8-9). The expended asci, consisting of the collapsed lower wall and the tubular extension of the secondary wall, often remain in situ in the hymenium.

DISCUSSION

The results of this study support a recognition of the asterinaceae and related families as a sister group to the loculoascomycetes which were defined by LUTTRELL (1955) as « Ascis bitunicatis, in ascostromate evolutis ». The *Asterina* ascus cannot be equated with the bitunicate ascus as defined by LUTTRELL (1951) and implicated by ERIKSSON (1984). The ascus structure is similar to that described by HONEGGER (1978) as the « type eu-archaeascé of LETROUIT-GALINOU, 1973 » that ERIKSSON (1981) termed « rostrate ».

The asci from *Asterina correicola* Cooke & Massee and *Asterina* sp. were said to develop from proliferating croziers (SWART, 1969). Their development and the sympodially produced asci of *A. carbonacea* originate in a manner suggestive of the mode of ascus formation discussed by PARGUEY-LEDUC (1977) as « Dangeardies simples ». The asci of *Placoasterella baileyi* were found to arise from a terminal cell of the fertile member of a duel hyphal system making up the asco-


X
NA
D2
D1
C
B
A
A
X
S
B
DO
NA
AS
PW
C
AS
EW
D

carp (TYSON & GRIFFITHS, 1976a). The ascus-bearing cell was noted to ultimately be connected to a binucleate penultimate cell.

THEISSEN (1913) described the ascus of the genus *Asterina* species as having ■ double tunica with the inner sporesack tightly surrounding the spores and the outer, mostly very thin, slimy tunica. The illustrations of the ascus in this early review of the genus *Asterina* indicate a thick nonlayered wall delimiting the ascus ; no details of the apical region were provided. The outer tunica was likely a reference to the reaction that was obtained when iodine was applied to the ascus in several species.

Sudan Black B stains for total lipids (O'BRIEN & McCULLY, 1981). The blue reaction in asci without KOH pretreatment possibly indicates the presence of isolichenin (CULBERSON, 1969). The light blue staining of the ascus dome and the darker blue reaction of the inner surface of the secondary wall with KOH pretreatment might be indicative of curled molecular segments presents in the secondary wall material which is destined to undergo stretching (BARAL, 1987).

Spore ejaculation triggers the phenomenon which is the historic basis of characterization of the bitunicate ascus (LUTTRELL, 1951). The primary wall ruptures in the apical region and slides down the secondary wall which stretches into a tube through which the ascospores are distributed (REYNOLDS, 1971 ; BECKETT & al., 1974 ; BEZERRA & KIMBROUGH, 1982 ; PARGUEY-LEDUC, 1977 ; PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1982 ; BELLEMÈRE & HAFELLNER, 1982 ; NIYO & al., 1986).

Fig. 9 — Diagramatic representations of the *Asterina carbonacea* Cooke wall structure as seen in light and electron microscopic views. A comparison of the undischarged ascus with the ascus with the inner wall extended. A. The undischarged ascus in an electron microscopic view. B. The discharged ascus in an electron microscopic view. At ascospore discharge, the ascus wall will rupture (X) near where Couche D1 forms an enlargement and adjacent to the Couche D2 or « apical dome » portion of the ascus. Stress lines are formed over the nasse apicale (NA) in Couche D2. Couche D2 extends beyond the remainder of the ascus wall (S) at the rupture (X). C. The undischarged ascus in ■ light microscopic view. The primary wall (PW) encloses the secondary wall which is largely deposited ■■ an apical dome (DO) where an apical chamber with a nasse apicale (NA) occurs. The bicelled ascospores (AS) are contained in an oval chamber shaped during ascosporogenesis by the stretching of the secondary wall material. D. The discharged ascus in a light microscopic view. The primary wall (PW) splits to allow the extension of the inner elastic wall (EW). The ascospores (AS) distend the inner canal of the extended wall as they are discharged from the lower portion of the ascus. The arrows indicate direction of ascospore discharge in the undischarged ascus. A = Couche A, B = Couche B, C = Couche C, D1 = Couche D1, D2 = Couche D2.

Fig. 9 — Représentations schématiques de la structure de la paroi d'*Asterina carbonacea* Cooke, observée au microscope optique et électronique. Comparaison d'un asque fermé et d'un asque dont la paroi interne est étirée. A. Asque fermé, en microscopie électronique. B. Asque ouvert, en microscopie électronique. A l'éjection de l'ascospore, la paroi de l'asque se rompt (X) à l'endroit où la Couche D1 est élargie et adjacente à la couche D2 (« dôme apical » de l'asque). Des lignes de scission se créent dans la couche D2, au-dessus de la nasse apicale (NA). La Couche D2 s'étire au-delà de la paroi ascale (S) au point de rupture (X). C. Asque fermé, en microscopie optique. La paroi primaire (PW) entoure la paroi secondaire qui forme un dôme apical (DO) où apparaît une chambre apicale avec une nasse apicale (NA). Les ascospores bicellulaires (AS) sont contenues dans une chambre ovale formée au cours de l'ascosporogenèse par une extention de la paroi secondaire. D. Asque ouvert, en microscopie optique. La paroi primaire (PW) se divise pour permettre l'extension de la paroi élastique intérieure (EW). Les ascospores (AS) distendent le canal interne de la paroi lorsqu'elles sont expulsées de la partie inférieure de l'asque. Les flèches indiquent la direction de l'éjection des ascospores dans l'asque fermé. A = Couche A, B = Couche B, C = Couche C, D1 = Couche D1, D2 = Couche D2.

The technique stressed by BELLEMÈRE (1971) and other French workers for observations on the ascus wall structure at the resolution of the electron microscope is that attributed to THIÉRY (1967) ; the deposition patterns of the polysaccharides comprising the ascus wall were enhanced with thiocarbohydrazide or thiosemicarbazide and with silver proteinate staining. On the other hand, other recent workers such as HONEGGER (1985) and NIYO & al. (1986) were able to discern the wall patterns with the use of uranyl acetate and lead citrate, as was done in this study. I believe that the Thiéry Technique is very useful for improving the constrast of micrographs but is not a neccessity for the interpretation of the ascus wall structure.

The *Asterina* ascus appears bitunicate at the resolution of the light microscope (Fig. 9 A). The formation of this ascus follows the same sequential pattern as that of the bitunicate ascus (REYNOLDS, 1971). Yet, the wall structure is not the same (Fig. 9). The distribution of the banded pattern secondary wall, Couche D (BELLEMÈRE, 1971), is different than that of the bitunicate ascus with separable wall. The Couche D layer is characterized by the vertical band pattern of the bitunicate ascus, yet this secondary wall material is measurably more concentrated in the apical portion of the ascus. The bulge of Couche D1 at the point where Couche D2 begins is suggestive of the thickening of the wall found by SAMUELSON & KIMBROUGH (1978) in *Thelebolus polysporus* (Marst.) Otani & Kanzawa. Unlike the ascus of that species, the upper portion of the *Asterina* ascus wall does not undergo ■ separation into an ectotunica and an endotunica during spore ejaculation. Couche D2 stretches into a tube without separation from the rest of the wall. The ascospores are dispersed through the resultant channel in the extension of the wall.

The presence of density lines that run parallel to the periphery of the ascus and across the vertical columns of the banded pattern are an indicator of the reorientation of the secondary wall material during ascospore formation. The increase in density of these lines just above the nasse apicale might result from the focus of stress in the stretching ascus at that pivotal point ; the meniscus reported by ERIKSSON (1981) likely results from mechanical disruption of the wall at this stress point. Applying the observation of MARTIN & al. (1976) that the « contorted plasmalemma » is related to an increase in the ascus volume, I suggest that Couche D1 absorbs the changes in the ascus wall during ascosporogenesis while Couche D2 functions during ascospore dispersal.

The definition of an ascostroma in HAWKSWORTH & al. (1983) is a stroma in or on which asci are produced ; the term was said by them to be usually restricted to groups with ascolocular ontogeny. These editors give the definition of Ascoloculares as ascomycetes having asci developing in cavities in a preformed stroma. An alternate term, pseudothecium, was defined as an ascostromatic ascocarp having asci in numerous unwalled locules. The ascocarp formation by *Asterina*, including *A. carbonacea*, was investigated by GAILLARD (1893) who found that the fruitbody developed from a hyphal cell before the appearance of the ascus. RYAN (1926) confirmed this sequence in eighteen illustrated species of *Asterina*.

The ascoma of *Asterina* begins from a hyphal cell that, in turn, is the source of a duel hyphal system. The first developed system forms the ascocarp, and the second forms the ascogenous system. Therefore the ascoma is an ascostroma sensu LUTTRELL (1951).

The systematic implication of this study is that broached by LUTTRELL (1955) in his discussion of the exceptions (the Coryneliales and the Coronophorales) to the definition of the subclass Loculoascomycetes because of the occurrence of a nonbitunicate ascus in an ascostroma. Extrapolating the results of this study, the groups pointed out by LUTTRELL (1973) as having an ascus that is « globose to broad oblong or clavate (less than 3 times as long as broad) » apparently also comprise ▪ major exception to his definition. This ascus type is found in the Asterinaceae as well as the Seuratiaceae and possibly other ascostromatic families such as the Philipselliaceae. These families are predicted as nonbitunicate-ascus ascostromatic, but not Euascomycetes, sister taxa that are phylogenetically near the ascostromatic ascomycetes with a bitunicate ascus.

REFERENCES

ARNAUD A., 1918 — Les Astérinées. Thèse, Faculté des Sciences de Paris. Montpellier, Coulet.

BARAL H. O., 1987 — Lugol's solution/IKI versus Melzer's reagent : hemiamyloidity, a universal feature of the ascus wall. *Mycotaxon* 29 : 299-450.

BECKETT A., HEATH I. B. and McLAUGHLIN D. J., 1974 — *An atlas of fungal ultrastructure*. London, Longman.

BELLEMÈRE A., 1971 — Les asques et les apothecies des Discomycètes bituniqués. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, sér. 12, 12 : 429-464.

BELLEMÈRE A. et HAFELLNER J., 1982 — Etude ultrastructurale des asques bituniqués de l'*Hysterographium fraxini* (Pers. ex Fr.) de Not. (Ascomycètes, Hystériales) : Développement de la paroi et déhiscence. *Cryptogamie, Mycol.* 3 : 261-295.

BEZERRA J.L. and KIMBROUGH J. W., 1982 — Culture and cytological development of *Rhytidhysterium rufulum* on Citrus. *Canad. J. Bot.* 60 : 568-579.

CULBERSON C. F., 1969 — *Chemical and botanical guide to lichen products*. Chapal Hill, The University of North Carolina Press.

ERIKSSON O., 1981 — The families of bitunicate Ascomycetes. *Opera Bot.* 60 : 1-220.

ERIKSSON O., 1984 — Outline of the ascomycetes, 1984. *Systema Ascomycetum* 3. Umea, O. Eriksson : 1-72.

GAILLARD A., 1893 — Note sur les hyphopodies mycéliennes et la formation des périthèces des *Asterina*. *Bull. Soc. Mycol. France* 9 : 95.

HAWKSWORTH D. L., SUTTON ▪. C. and AINSWORTH G. C., 1983 — *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi (including the lichens)*, 7th edition. Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute.

HONEGGER R., 1978 — The ascus apex in lichenized fungi I. The *Lecanora* -, *Peltigera* - and *Teloschistes* - types. *Lichenologist* 10 : 47-67.

HONEGGER R., 1985 — Ascus structure and ascospore formation in the lichen-forming *Chaenotheca chrysocephala* (Caliciales). *Sydowia* 38 : 146-157.

LETROUIT-GALINOU M. A., 1973 — Les asques des lichens et le type archaeascé. *The Bryologist* 76 : 30-47.

LÉVEILLÉ J. H., 1845 — Champignons exotiques. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, sér. 3, 3 : 38-71.

LUTTRELL E. S., 1951 — Taxonomy of the pyrenomycetes. *Univ. Missouri Stud.* 24 : 1-120.

LUTTRELL E. S., 1955 — The ascostromatic ascomycetes. *Mycologia* 47 : 511-532.

LUTTRELL E. S., 1973 — Loculoascomycetes. *In* : AINSWORTH G. C., SPARROW F. K. & SUSSMAN A. S., *The fungi, an advanced treatise*, Vol. IVA. London, Academic Press : 135-219.

MARTIN M., GAY J. L. and JACSKON G. V. H., 1976 — Electron microscopic study of developing and mature cleistothecia of *Sphaerotheca mors-uvae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66 : 473-487.

NIYO K. A., McNABB H. S., Jr., and TIFFANY L. H., 1986 — Ultrastructure of the ascocarps, asci, and ascospores of *Mycosphaerella populorum*. *Mycologia* 78 : 202-212.

O'BRIEN T. P. and McCULLY M. E., 1981 — The study of plant structure, principles and selected methods. Melbourne, Australia, Termarcarphi Pty. Ltd.

OREJUELA C. G., 1944 — New or heretofore unreported species of the higher Ascomycetes from Colombia and Venezuela. *Mycologia* 36 : 429-459.

PARGUEY-LEDUC A. et CHADEFAUD M., 1963 — Les asques du *Cainia incarcerata* (Desm.) von Arx et Müller et la position systématique du genre *Cainia*. *Rev. Mycol. (Paris)* 28 : 200-234.

PARGUEY-LEDUC A., 1977 — Les asques des Pyrénomycètes. *Rev. Mycol. (Paris)* 41 : 281-339.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M. C., 1982 — La paroi des asques chez les Pyrénomycètes : étude ultrastructurale. I. Les asques bituniqués typiques. *Canad. J. Bot.* 60 : 1222-1230.

REYNOLDS D. R., 1971 — Wall structure of a bitunicate ascus. *Planta* 98 : 244-257.

RYAN R. W., 1926 — The development of the perithecia in the Microthyriaceae and a comparison with *Meliola*. *Mycologia* 18 : 100-110.

SAMUELSON D. A. and KIMBROUGH J. W., 1978 — Asci of the Pezizales. IV. The apical apparatus of *Thelebolus*. *Bot. Gaz.* 139 : 346-361.

SHERWOOD M. A., 1981 — Convergent evolution in Discomycetes from bark and wood. *Bot. J. Linn. Soc.* 82 : 15-34.

STEVENSON J. A., 1943 — Fungi novi denominati I. *Mycologia* 35 : 629-637.

SWART H. J., 1969 — Proliferating croziers in *Asterina*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 53 : 322-323.

THEISSEN F. von, 1913 — Die Gattung *Asterina* in systematischer Darstellung. *Abh. K. K. Zool.-Bot. Ges. Wien* 7 : 1-130, Pl. 1-8.

THIÉRY J.-P., 1967 — Mise en évidence des polysaccharides sur les coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6 : 987-1018.

TYSON K. and GRIFFITHS D. A., 1976a — Developmental morphology and fine structure of *Placoasterella baileyi* I. Host/parasite relationships and development of the ascocarp centrum. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66 : 249-262.

TYSON K. and GRIFFITHS D. A., 1976b — Developmental morphology and fine structure of *Placoasterella baileyi* II. Ascus and ascospore development. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66 : 263-279.

WARD H. M., 1882 — Researches on the morphology and life history of a tropical pyrenomycetous fungus. *Quart. J. Microscop. Sci.* 22 : 347-354, pl. 28-29.

Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (4) : 269-288

REMARQUES À PROPOS DE L'ULTRASTRUCTURE D'ASCOSPORES « ALBINOS » OU « GRANULEUSES » DE MUTANTS D'*ASCOBOLUS IMMERSUS* PERS. (gène b8).

par L.M. MELENDEZ-HOWELL*, A. BELLEMÈRE** et J.-L. ROSSIGNOL***

RÉSUMÉ — Les ascospores du mutant albinos (gène b8) de l'*Ascobolus immersus* outre leur défaut de pigmentation présentent certains caractères ultrastructuraux du mutant granuleux (sur le même gène) en particulier une périspore interne discontinue se limitant à des loupes. Une modification du métabolisme lipidique associée à la perturbation de certains échanges entre l'ascospore en développement et l'épiplasme de l'asque paraît accompagner l'absence de pigmentation des albinos.

SUMMARY — In *Ascobolus immersus* the non pigmented ascospores of the albino mutant (b8 gene) show some ultrastructural characters of the granular mutant (on the same gene) specially a discontinuous internal perispore restricted to a few lens. The absence pigmentation albino mutant spores is probably associated to a modification of lipid metabolism in connection with perturbations of the exchanges between the developing ascospore and the ascus epiplasm.

MOTS CLÉS : *Ascobolus*, ascospores, mutants, pigmentation, lipides.

* UA 257, CNRS, Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle, 12, rue Buffon, F 75005 Paris, France.

** Laboratoire de Mycologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon (Services de Saint-Cloud), Grille d'Honneur, Parc de Saint-Cloud, F 92211 Saint-Cloud Cedex, France.

*** Laboratoire IMG, Bâtiment 400, Université Paris-Sud, F 91405 ORSAY Cedex, France.

Chez le champignon Ascomycète hétérothallique *Ascobolus immersus* 19 gènes contrôlent la couleur de l'ascopore (NICOLAS & al., 1981). L'examen ultrastructural du développement des ascospores chez deux mutants (gène b_8) de l'*Ascobolus immersus* l'un à ascospores albinos (b_8) et l'autre à ascospores granuleuses (b_8-g) fait suite à une étude de la souche sauvage et de deux mutants (gène b_2), l'un à ascospores « albinos » et l'autre à ascospores « ceinturées » publiée antérieurement (BELLEMÈRE & al., 1981). Les techniques mises en œuvre, les définitions des divers constituants morphologiques, de la paroi ascosporale, et celle des principaux stades de leur développement utilisées ici ont été indiquées dans cette précédente publication.

RÉSULTATS

I - Les ascospores du mutant albinos (gène b_8) (Pl.I à IV ; Fig.1 A_1 à G_1).

Dans ses grandes lignes, le développement des ascospores de ce mutant est analogue à celui de la souche sauvage et des mutants sur le gène b_2. Il présente cependant quelques caractères originaux et remarquables qui seront analysés successivement.

1. Les loupes de la périspore.

L'essentiel de la périspore, Patag +, qui correspond à la périspore moyenne de la souche sauvage contient dans sa partie la plus profonde des portions Patag – (appelées ici loupes) en forme de lentille plan-convexe dont la face saillante est dirigée vers l'extérieur. Ces lentilles n'existent pas encore au tout début du développement de la paroi ascoporale (Pl.I-B ; Fig. $1A_1$). Au plus jeune stade où on les observe elles sont nettement hémisphériques (Pl.I-C ; Fig. $1B_1$). Chaque spore n'en contient que quelques-unes. La base plane de ces loupes est séparée de la paroi intermédiaire de la spore par une très mince couche (cs), plus dense et un peu plus réactive que le reste de la périspore (Pl.I-C, E ; Fig. $1B_1$). Au contact de la face convexe de chaque loupe, le contenu de celle-ci devient très clair, formant une très mince zone externe (ze), finement irrégulière, bien distincte (Pl.I-C ; Fig. $1B_1$). A un stade un peu plus âgé (Pl.II-A ; Fig. $1C_1$), une masse interne (mi) subsphérique, d'aspect plus foncé, se forme dans la loupe tandis que la mince couche basale sombre est un peu moins réactive. Plus tard, cette masse interne envahit la majeure partie de la loupe (Pl.II-C, D, Pl.III-B ; Fig. $1D_1$, E_1). La substance fondamentale originelle (so) de celle-ci se réduit désormais à des lambeaux périphériques dont la texture est plus ou moins irrégulièrement vésiculeuse. L'étroite zone claire (ze) qui borde la loupe vers l'extérieur s'épaissit un peu ; on y discerne de fins trabécules radiaires mettant en relation la partie interne de la loupe avec la périspore. Quand la spore est mûre (PL.IV-A ; Fig. $1F_1$, G_1), la masse interne de la loupe est devenue plus réactive ainsi que les lambeaux de la substance originelle ; sous la loupe, la mince bande de périspore (cs) est maintenant revêtue d'une étroite couche claire qui fait suite vers l'intérieur à cette zone externe transparente de la loupe. La zone externe claire de la loupe s'est épaissie aux endroits où persistent des lambeaux (la) de la substance originelle de la loupe. Elle vient plus ou moins faire saillie dans la périspore et les loupes paraissent ainsi un peu boursouflées.

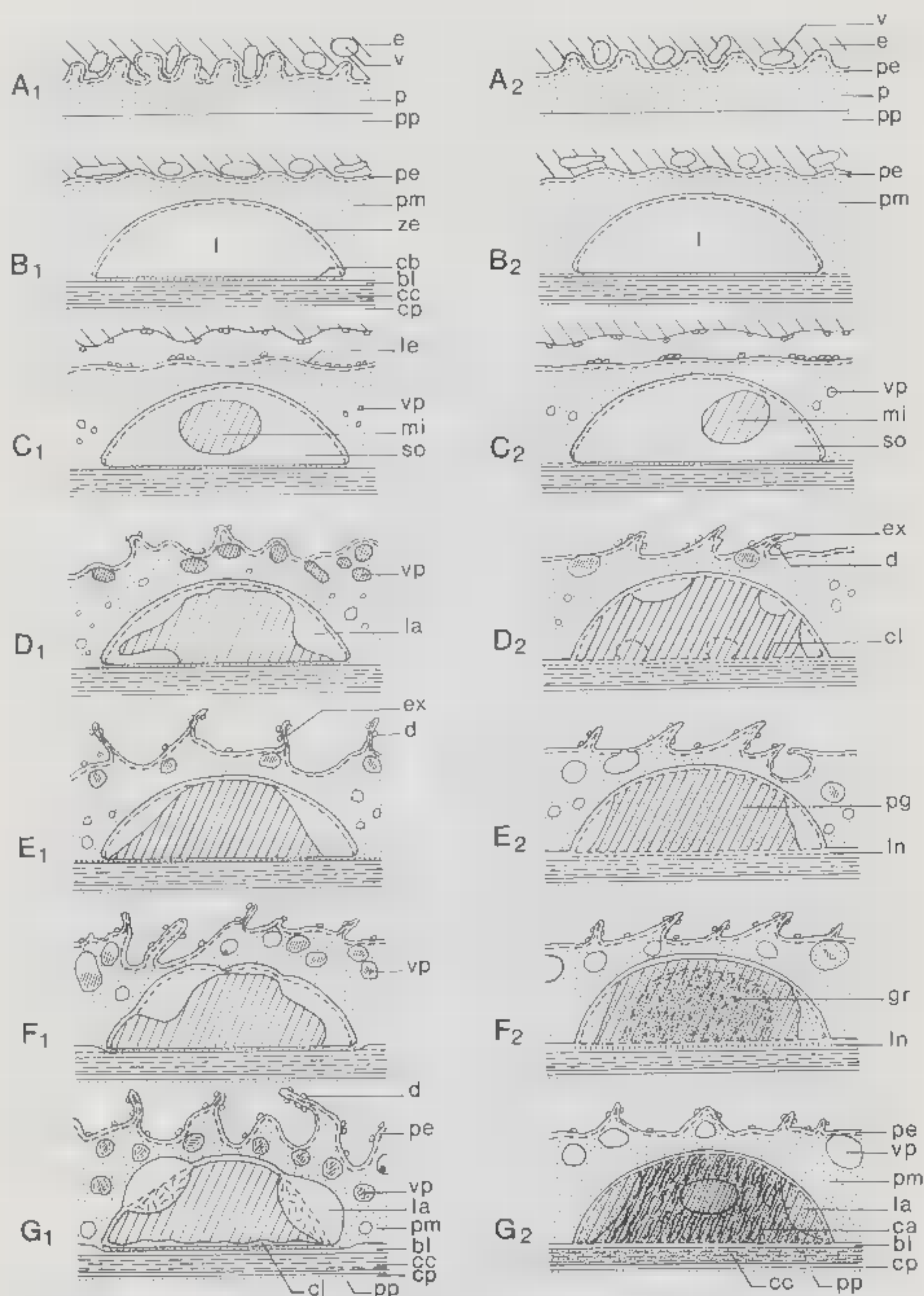


Fig. 1 — *Abscobolus immersus*. Schémas du développement des loupes de la périspore chez deux mutants du gène bB, l'un albinos (A1 à G1) et l'autre granuleux (A2 à G2). Voir le texte.

Fig. 1 — *Abscobolus immersus*. Schemes of the development of perispore lens in two mutants of bB gene ; one is albino (A1 to G1), the other is granular (A2 to G2). See the text.

2. Les vésicules de la périspore.

Outre les loupes, la périspore contient aussi, à certains stades, de nombreuses vésicules subglobuleuses de tailles diverses et d'aspect clair (PL.II-C ; Fig. $1D_1$). Ces vésicules n'apparaissent pas avant qu'une masse interne ne se soit formée à l'intérieur de chacune des loupes (Pl.II-A). Au début, elles sont toutes de petite taille et leur contenu est transparent (Pl.II-B ; Fig. $1C_1$).

Ultérieurement, à la périphérie de la spore, on observe aussi de grosses vésicules à contenu légèrement réactif (PL.II-C, III-D, IV ; Fig. $1D_1$ à G_1).

Ceci porterait à croire que les petites vésicules naissent dans la partie profonde de la périspore, se déplacent de façon centrifuge en s'accroissant sans doute par fusion. Des figures semblent indiquer que certaines grosses vésicules peuvent confluer avec la limitante externe de la spore et libérer leur contenu à l'extérieur (Pl.III-D).

Il est remarquable que, dans les spores âgées, la structure de ces grosses vésicules soit analogue à celle des loupes (Pl.IV-A à D ; Fig. $1G_1$).

3. La surface externe de la spore.

La surface de la très jeune ascospore montre des ondulations assez profondes, relativement étroites et régulières (Pl.I-A ; Fig. $1A_1$). Rapidement celles-ci s'atténuent très nettement (Pl.I-B, C ; Fig. $1B_1$). Quand des vésicules sont présentes dans la périspore (PL.II-C), des dépôts localisés et réactifs viennent se plaquer sur la spore ainsi que sur la surface interne de l'épiplasme (Pl.III-C). La surface de la spore devient ensuite irrégulière (Pl.II-D, III-D ; Fig. $1D_1$ à F_1) : elle forme des extrusions étroites et minces. Recouvertes de dépôts réactifs en forme de gouttelettes, celles-ci ont un aspect caractéristique qui rappelle celui d'un chapelet de saucisses (Pl.IV-D ; Fig.$1G_1$).

4. La structure de la paroi intermédiaire de l'ascospore.

Elle est toujours complexe et d'analyse difficile en raison de sa minceur et d'artéfacts résultants de défauts, même minimes, de l'orthogonalité des coupes. On a vu plus haut que sous les jeunes loupes existe une mince couche basale de périspore nettement plus réactive (Pl.I-C, E ; Fig. $1B_1$). Sous celle-ci, une mince couche blanche est assez bien marquée (Pl.I-C) à l'extérieur d'une couche castor faiblement réactive au début.

Quand une masse interne sombre se développe dans les loupes, la partie la plus interne de la périspore devient plus réactive sur toute l'étendue de la spore et non pas seulement sous la base des loupes (Pl.III-A ; Fig. $1E_1$). Puis, ultérieurement, cette mince couche réactive disparaît (Fig. $1F_1$) ; en dehors des loupes, la couche blanche devient plus épaisse et elle est clivée par une très mince lamelle réactive (Pl.III-B ; Fig. $1F_1$) qui est d'ailleurs transitoire (Pl.IV-B ; Fig. $1G_1$).

5. Les globules lipidiques du sporoplasme.

Ces globules lipidiques, qui sont toujours relativement abondants, sont surtout remarquables dans les jeunes ascospores encore dépourvues de loupes (Pl.I-B, D). A ce stade, en effet, certains d'entre eux paraissent entourés d'une mince zone claire d'épaisseur irrégulière bordée d'une membrane comme s'ils étaient contenus dans un compartiment de séquestration.

Dans les ascospores mûres (Pl.IV-E), les globules lipidiques ont un aspect banal ; ils sont légèrement plus réactifs au test de Patag vers l'extérieur et contiennent quelques grains plus opaques aux électrons.

On sait que les ascospores des mutants albinos (gène b_2) diffèrent des ascospores sauvages non seulement par l'absence de pigmentation de la partie la plus profonde de la périspore (périspore interne) mais, de plus, par la structure de la surface sporale, de la périspore moyenne, de la paroi intermédiaire et des globules lipidiques du sporoplasme (BELLEMÈRE & al., 1981).

Les ascospores du mutant albinos (gène b_8), elles aussi dépourvues de pigment, diffèrent cependant des ascospores précédentes.

— Tout d'abord, leur périspore interne ne forme pas une couche continue, mais est réduite à des loupes séparées, ce qui est inattendu.

— De plus, leur surface est beaucoup plus irrégulière, avec des extrusions importantes.

— Leur paroi intermédiaire ne présente pas de lamelle noire permanente et leur périspore moyenne ne contient pas de granules Patag +.

— Enfin, les globules lipidiques de leur sporoplasme n'ont pas l'aspect caractéristique « en passoire » de ceux de l'albinos b_2.

L'étude d'un autre mutant de ce gène b_8 (mutant granuleux) permet d'apporter quelques éclaircissements à propos de ces modifications structurales.

II - Les ascospores du mutant granuleux (gène b_8) (Pl.V à VIII ; Fig.1 A_2 à G_2).

Seules certaines parties de la surface de ces ascospores sont pigmentées, ce qui leur confère un aspect granuleux au microscope photonique.

Dans ses grandes lignes, le développement de ces ascospores est analogue à celui des ascospores du mutant albinos (gène b_8). Toutefois, en fin de maturation, un dépôt pigmentaire se forme dans la paroi sporale. On n'envisagera ici que les points remarquables de ce développement.

1. Les loupes de la périspore.

Chez les ascospores du mutant granuleux (gène b_8), la périspore comporte des loupes dont la structure et le développement sont analogues à ceux décrits plus haut chez le mutant albinos (Pl.V-B, D, F ; VI-A ; VII-A, B ; Fig. 1A_2 à G_2).

2. La pigmentation.

L'aspect granuleux de la spore résulte de sa pigmentation qui affecte essentiellement la masse interne de chacune des loupes et de façon moins intense et, plus tardive, la substance fondamentale qui entoure celle-ci ainsi que la couche castor de la paroi intermédiaire (Fig. 1G_2).

Les premières traces de pigmentation apparaissent d'abord de façon dispersée dans la masse interne des loupes, sous forme de petits grains très fins bien réactifs au test de Thiéry (Pl.VII-A ; Fig. 1E_2).

Plus tard (Pl.VII-B), des granules de pigmentation plus gros se forment dans la masse interne des loupes. Ils sont constitués d'une masse amorphe peu réactive contenant un nombre réduit de petits grains fortement Patag + . Ces granules peuvent, çà et là, être plus ou moins fusionnés en bâtonnets sinueux, surtout vers la périphérie de la masse interne (Pl.VII-B, VIII-A ; Fig. 1F_2). Dans les lambeaux de substance fondamentale de la loupe apparaissent alors de petits grains très fins, dispersés, moins réactifs que ceux des granules (Pl.VII-B). Ultérieurement, les bâtonnets sinueux de la périphérie de la masse interne de la loupe deviennent plus nombreux, se soudent plus ou moins les uns aux autres et forment ainsi une sorte de mince croûte irrégulière autour de cette masse (Pl.VIII-B).

Quand la spore est mûre (Pl.VIII-C ; Fig.1G_2), la densité et la réactivité de la masse interne des loupes sont renforcées par des sortes de cannelures qui résultent probablement de la fusion de nombreux bâtonnets sinueux mentionnés plus haut. Ces cannelures irrégulières, rapprochées, très réactives, sont plus ou moins parallèles et disposées un peu obliquement par rapport au plan équatorial de la spore. La partie centrale de la masse interne des loupes peut être dépourvue de cannelures (Pl.VII-C) et présenter alors un aspect grisâtre assez uniforme. Au cours de la maturation, la substance fondamentale de la loupe continue à se charger de pigment, et, par suite, son aspect devient alors analogue à celui que présentait, au début, la masse interne ; elle ne semble pas être pigmentée davantage quand la spore est mûre. La couche castor se charge peu à peu de pigment et à la fin devient très dense et très réactive.

3. La structure de la périspore.

La périspore des ascospores granuleuses (Pl.VI-A, E ; Fig. 1D_2) a une structure analogue à celle des ascospores albinos (gène b_8). Elle contient des vésicules dont les plus externes, qui sont plus grosses, semblent aussi pouvoir se déverser à la surface de la spore. Certaines de ces grosses vésicules peuvent contenir des granules de pigmentation (Pl.VII-B).

4. Surface sporale.

Elle rappelle celle des ascospores albinos (gène b_8) aux stades jeunes (Pl.V-A ; Fig. 1A_2) comme aux stades plus âgés. Lors de ceux-ci, on y observe aussi des extrusions en forme de « chapelets de saucisses » parfois plus spectaculaires encore que celles du mutant albinos (Pl.VI-C, D ; Fig. 1D_2 à F_2). La surface de la spore mûre est aussi très irrégulière (PL.VII-A ; Fig. 1G_2).

5. Paroi intermédiaire.

Aux jeunes stades du développement (Pl.V-B, C, D ; Fig.1B_2, C_2), la base de la périspore est renforcée d'une mince couche basale lamellaire très réactive au test de Thiéry (mais non réactive au citrate ; Pl.V-F) qui recouvre la couche blanche de la paroi intermédiaire sur toute la surface de la spore.

Un peu plus tard, une très mince couche claire, Patag —, apparaît à l'extérieur de la couche basale (Pl.VI-A ; Fig. 1D_2) et cela sur toute la surface de la spore ; son épaisseur d'abord irrégulière surtout sous les loupes, s'uniformise ensuite. La couche basale réactive se trouve ainsi placée dans la position de la lamelle noire observée chez les ascospores de la lignée sauvage, au milieu de la couche blanche de la paroi intermédiaire.

Plus tard, lorsque les grains fins de pigmentation commencent à se déposer (Pl.VII-A ; Fig. $1E_2$), la lamelle noire perd sa réactivité en dehors des loupes. Bientôt elle ne forme plus sous celles-ci que de très courtes striations transversales, fines et contiguës (Patag+) (Pl.VII-B ; Fig. $1F_2$) et elle s'efface plus ou moins complètement sur le reste de la surface sporale. Quand les spores sont mûres, la lamelle noire n'est plus distincte (Pl.VIII-C ; Fig. $1G_2$).

6. Les globules lipidiques du sporoplasme.

Ces globules (Pl.V-E, VI-B) ont un aspect analogue à ceux de la lignée sauvage ; à la périphérie, ils sont un peu plus granuleux que ceux du mutant albinos (gène b_8).

En dehors de la pigmentation des loupes, les différences ultrastructurales entre le mutant granuleux (gène b_8) et le mutant albinos (gène b_8) sont faibles : chez les deux mutants la structure de la périspore est analogue, la surface sporale présente également des extrusions bien marquées, les différences dans l'aspect des globules lipidiques du sporoplasme et dans la paroi intermédiaire de la partie profonde sont légères.

CONCLUSION

Il est remarquable que la mise en place du caractère albinos portant sur le gène b_8 s'accompagne de l'établissement d'un caractère propre au mutant granuleux (limitation de la périspore interne à des loupes séparées) et que les caractères ultrastructuraux distinctifs du mutant albinos soient des modulations de ceux du mutant granuleux, le mutant albinos étant en quelque sorte une expression extrême du mutant granuleux.

Pour comparer utilement les albinos b_2 et b_8, il convient donc de faire abstraction chez ce dernier des caractères propres au mutant granuleux, pigmentation mise à part. Alors il apparaît que les modifications qui, chez ces deux mutants, accompagnent l'absence de pigment sont relativement discrètes et en nombre réduit : structure et localisation (vacuolaire ou non) des globules lipidiques du sporoplasme, détails de l'organisation de la paroi intermédiaire de l'ascospore (mince couche réactive externe et lamelle noire), importance relative des irrégularités de la surface sporale.

Parmi ces caractères, ce sont ceux des globules lipidiques qui sont les premiers perceptibles au cours du développement ; leur particularité est même affirmée avant la formation des loupes chez les albinos b_8.

L'expression du caractère albinos est donc directement en relation avec le métabolisme lipidique de la spore. La modification de celui-ci semble perturber les échanges entre la spore et l'épiplasme de l'asque car, non seulement la surface sporale est affectée, mais aussi la paroi intermédiaire dont on a déjà suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de ces échanges (loc. cit.).

La voie vers l'absence de pigment s'établit donc assez précocement mais semble être indépendante ou avoir des rapports très lâches avec la voie menant à l'édification de la structure de type granuleux puisque celle-ci peut s'établir au cours du développement de l'albinos b_8.

L'étude de doubles mutants, soit entièrement albinos à la fois sur le gène b_2 et sur le gène b_8, soit albinos pour b_2 et granuleux sur b_8, pourrait se révéler intéressante en permettant une analyse plus fine des conditions d'expression du caractère albinos.

REMERCIEMENTS

Nous avons plaisir à remercier pour leur assistance technique H., CHACUN et M.-C. MALHERBE pour les coupes ultrafines, M. LETALNET et E. VAST pour les photographies, T. CASSES pour les dessins, E. VADE pour la frappe du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

BELLEMÈRE A., MELENDEZ-HOWELL L.M., NICOLAS A. et ROSSIGNOL J.-L., 1981 — Etude ultrastructurale comparative du développement des ascospores chez la lignée sauvage et chez des mutants à ascospores « ceinturées » ou « albinos » de l'*Ascobolus immersus* Pers. ex. Fr. *Cryptogamie, Mycol.* 2 : 299-359.

NICOLAS A., ARNAISE S., HAEDENS V. and ROSSIGNOL J.-L., 1981 — Ascospore mutants and genetic map of *Ascobolus immersus* stock 28. *J. Gen. Microbiol.* 125 : 257-272.

ABRÉVIATIONS DES LÉGENDES DES PLANCHES

b	bâtonnets de pigment
bl	couche blanche
ca	cannelure
cb	couche basale sombre sous les loupes
cc	couche « castor »
cl	couche claire à la base d'une loupe
cp	couche « pollux »
cr	croûte pigmentée
d	dépôts
e	épiplasme
ex	extrusion de la surface sporale
g	glycogène
gf	grains fins de pigment
gl	globules lipidiques
gr	granules de pigment
l	loupe
la	lambeaux persistant de substance originelle de la loupe
le	limitante externe
ln	lamelle noire
m	mitochondrie
mi	masse interne de la loupe
p	périspore
pa	paroi de l'asque
pc	partie centrale de la masse interne
pe	périspore externe
pg	petits grains de pigments
pi	paroi intermédiaire
pl	plasmalemme
pm	périspore moyenne
pp	paroi propre de la spore
so	substance fondamentale originale de la loupe
sp	sporoplasme
spp	sporoplasme périphérique
v	vacuole
vp	vésicule de la périspore
ze	zone externe de la loupe

ABBREVIATIONS IN PLATES

b	rodlet of pigment
bl	white sheath
ca	fluting
cb	dark basal layer under the lens
cc	« castor » layer
cl	clear layer at the basis of a lens
cp	« pollux » layer
cr	pigmented crust
d	deposits
e	epiplasm
ex	extruded part on the spore surface
g	glycogen
gf	small granules of pigment
gl	lipid bodies
gr	big granules of pigment
l	lens
la	persisting shreds of original lens substance
le	investing membrane
ln	black sheath
m	mitochrondria
mi	internal part of the lens
p	perispore
pa	ascus wall
pc	central body of the internal part
pe	external perispore
pg	small granules of pigment
pi	intermediate wall
pl	plasmalemma
pm	median perispore
pp	proper wall of the spore
so	original fundamental substance of the lens
sp	sporoplasm
spp	external sporoplasm
v	vacuole
vp	perispore vesicle
ze	external part of the lens

Planche I — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène b8). — A. Contact sinueux entre une jeune ascospore et l'épiplasme (Patag). — B. Jeune ascopore encore dépourvue de loupes (Patag). Remarquer les globules lipidiques dans des aires claires du sporoplasme (flèches) (cf. aussi ID). — C. Loupe bien développée dans la périspore moyenne (pm) d'une jeune ascospore (Patag). — D. Même ascospore que IB (Patag). Les globules lipidiques (gl) sont inclus dans des structures vacuolaires (flèches). — E. Détail de la paroi intermédiaire d'une ascospore un peu plus âgée que IC (Patag). La couche castor (cc) est mince, la couche pollux, sous-jacente, n'est pas encore clairement distincte.

Plate I — *Abscobolus immersus*, albino mutant (b8 gene). — A. Meandering contact between a young ascospore and epiplasm (Patag). — B. Young ascospore still without lens (Patag). Note the lipid bodies in clear areas of epiplasm (arrows) (cf. also ID). — C.Well developed lens in the median perispore (pm) in a young ascospore (Patag). — D. The same ascospore as IB (Patag). Lipid bodies are included in vacuolar structures (arrows). — E. Detail of the intermediate wall in a ascospore somewhat older than IC (Patag). Castor layer (cc) is thin, the underneath pollux layer is not yet clearly distinct.

Planche II — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène b8). — A. Ascospore séparée de l'épiplasme par une large vacuole. Dans une loupe de la périspore une masse interne (mi) se développe (Patag). — B. Présence de nombreuses petites vésicules dans la périspore (Patag). — C. La périspore contient de petites vésicules dans sa partie profonde et des vésicules plus volumineuses près de sa surface où l'on observe quelques extrusions. La loupe est presque complètement envahie par la masse interne (mi) (Patag). — D. Des dépôts réactifs (d) sont présents dans la vacuole de l'épiplasme (v) et à la surface de l'ascospsore. La masse interne de la loupe est importante (Patag).

Plate II — *Abscobolus immersus*, albino mutant (b8 gene). — A. The ascospore is separated from epiplasm by a big vacuole. In a perisporal lens an internal part (mi) is developing (Patag). — B. Numerous small vesicles are present in the perispore (Patag). — C. In the internal part of the perispore the vesicles are small ; they are bigger near its surface ; this shows some extrusions. The lens is nearly quite invaded by the internal part (mi) (Patag). — D. Reactive deposits (d) are present in epiplasmic vacuoles (v) and on the ascospore surface. The internal part of lens is important (Patag).

Planche III — *Abscobolus immersus*, mutant albinos (gène b8). — A. Détail de la paroi d'une ascospore au niveau de sa paroi intermédiaire, au-dessous d'une loupe (Patag). La mince couche de périspore qui se trouve sous la loupe est bien distincte. Une très mince couche réactive (flèche) limite la base de la périspore à ce stade (flèche). — B. Détail de la paroi d'une ascospore au niveau de sa paroi intermédiaire (Patag). En dehors de la loupe la couche blanche (bl) est plus épaisse que sous la loupe et paraît dédoublée (double flèche). — C. Dépôts réactifs (d) dans une vacuole de l'épiplasme et au contact entre celle-ci et le cytoplasme de l'asque (Patag). — D. Surface d'une ascospore en cours de maturation (Patag). Noter l'abondance de vésicules assez volumineuses à contenu réactif (vp). L'aspect de la surface sporale (triple flèche) suggère l'exocytose de ces vésicules.

Plate III — *Ascobolus immersus*, albino mutant (b8 gene). — A. Detail of an ascospore wall at the intermediate wall level, under a lens (Patag). The thin perispore sheath under the lens is quite distinct. At this stage a very thin reactive layer (arrow) limits the perispore basis (arrow). — B. Detail of ascospore wall at its intermediate wall level (Patag). Out of the lens the white sheath (bl) is thicker than under the lens and it seems made of two parts (double arrow). — C. Reactive deposits in an epiplasmic vacuole at its contact with the ascus cytoplasm (Patag). — D. Surface of a maturing ascospore (Patag). Note numerous well-developed vesicles with a reactive content (vp). Exocytose of these vesicles is suggested by the character of ascospore surface (tripple arrow).

Planche IV — *Ascobolus immersus*, mutant albinos (gène b8). — A. Ascospore proche de la maturité (Patag). La zone externe de la loupe (ze) est dilatée au niveau des lambeaux de substance fondamentale (la). Sous la masse interne réactive de la loupe une mince couche claire apparaît (flèche). — B. Paroi d'une ascospore proche de la maturité (Patag). La périspore contient de petites vésicules internes d'aspect clair. Le contenu d'une vésicule externe volumineuse est différencié. — C, D. Détails de la surface d'une ascospore proche de la maturité (Patag). La surface comporte des extrusions (ex) couvertes de dépôts

(d). Dans la périspore les vésicules (vp) ont un contenu différencié dont l'aspect rappelle celui des loupes. — E. Détail du sporoplasme d'une ascospore mûre (Patag). Le plasmalemme (pl) forme de nombreuses indentations (double flèche) ; le sporoplasme périphérique, clair, est dépourvu d'organites ; dans les mitochondries (m), qui ont perdu leur réactivité, les crêtes sont presque effacées.

Plate IV — *Ascobolus immersus*, albino mutant (bs gene). — A. Ascospore nearly mature (Patag). The external part of the lens (ze) is expanded where shreds of fundamental substance (la) are present. A thin clear layer is present under the reactive internal part of the lens (arrow). — B. Wall of a nearly mature ascospore (Patag). Small clear vesicles are contented in the perispore. An external voluminous vesicle has a differenciated content. — C, D. Details of the surface of a nearly mature ascospore (Patag). There are extrusions (ex) with deposits (d) on its surface. Vesicles (vp) in the perispore have a differentiated content which looks like the lens content. — E. Detail of the sporoplasme of a mature ascospore (Patag). Numerous indentations (double arrow) are seen on the plasmalemma (pl). No organelles are present in the clear external part of the sporoplasm ; mitochondria are not reactive, their crests have quite dissappeared.

Planche V — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène bs). — A. Paroi d'une jeune ascospore (Patag). Le contact entre la périspore (p) et l'épiplasme (e) est très sinueux. La paroi intermédiaire n'est pas encore distincte. B. Jeune ascospore avec une loupe (l) à la base de la périspore (Patag). La paroi intermédiaire, bien distincte, est complexe (cf. VC). — C. Détail de VB (Patag). Dans la paroi intermédiaire la zonation de la couche castor est très apparente. — D. Développement d'une masse interne dans une loupe de la périspore d'une ascospore assez jeune (Patag). — E. Détail du sporoplasme d'une jeune ascospore (Patag) (cf. ID). — F. Loupe de la périspore d'une ascospore assez jeune (acétate d'uranyle, citrate de plomb).

Plate V — *Ascobolus immersus*, granular mutant (bs gene). — A. Wall of a young ascospore (Patag). The contact between the perispore (p) and the epiplasm (e) is meandered. The intermediate wall is not yet distinct. — B. Young ascospore with a lens (l) in the perispore basis (Patag). The intermediate wall is quite distinct and complex (cf. VC). — C. Detail of VB (Patag). The castor layer is clearly underlayered. — D. An internal part is developing in a perisporal lens of a young ascospore (Patag). — E. Detail of the sporoplasm of a young ascospore (Patag). (cf. ID). — F. Lens in the perispore of a rather young ascospore (uranyl acetate, lead citrate).

Planche VI — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène bs). — A. Paroi d'une ascospore en cours de maturation (Patag). Dans la loupe de la périspore la masse interne (mi) est devenue très importante. Hors de la loupe la périspore contient de petites vésicules internes, claires, et des vésicules externes, plus grosses, à contenu réactif. La surface sporale est irrégulière. — B. Détail du sporoplasme d'une ascospore en maturation (Patag). (cf. IVE). — C. Détail de la surface d'une ascospore (Patag). Noter les extrusions irrégulières (ex) et les dépôts réactifs (d). — D. Détail de la surface d'une ascospore (acétate d'uranyle, citrate de plomb). Les extrusions filiformes (ex) portent des dépôts très réactifs disposés comme des chapelets de saucisses. — E. Détail de la périspore d'une ascospore (acétate d'uranyle, citrate de plomb). La périspore moyenne, claire, contient des vésicules (vp) un peu opaques.

Plate VI — *Ascobolus immersus*, granular mutant (bs gene). — A. Wall of a maturing ascospore (Patag). The internal part (mi) of perispore lens is now very important. Out of the lens there are small internal vesicles and bigger reactive external vesicles in the perispore. The ascospore surface is irregular. — B. Detail of the sporoplasm of a maturing ascospore (Patag) (cf. IVE). — C. Detail of an ascospore surface (Patag). Note irregular extrusions (ex) and reactive deposits (d). — D. Detail of an ascospore surface (uranyl acetate, lead citrate). Thread-like extrusions (ex) bear very reactive deposits remending beads of saussages. — E. Detail of the perispore of an ascospore (uranyl acetate, lead citrate). The clear median perispore contents rather dark vesicles (vp).

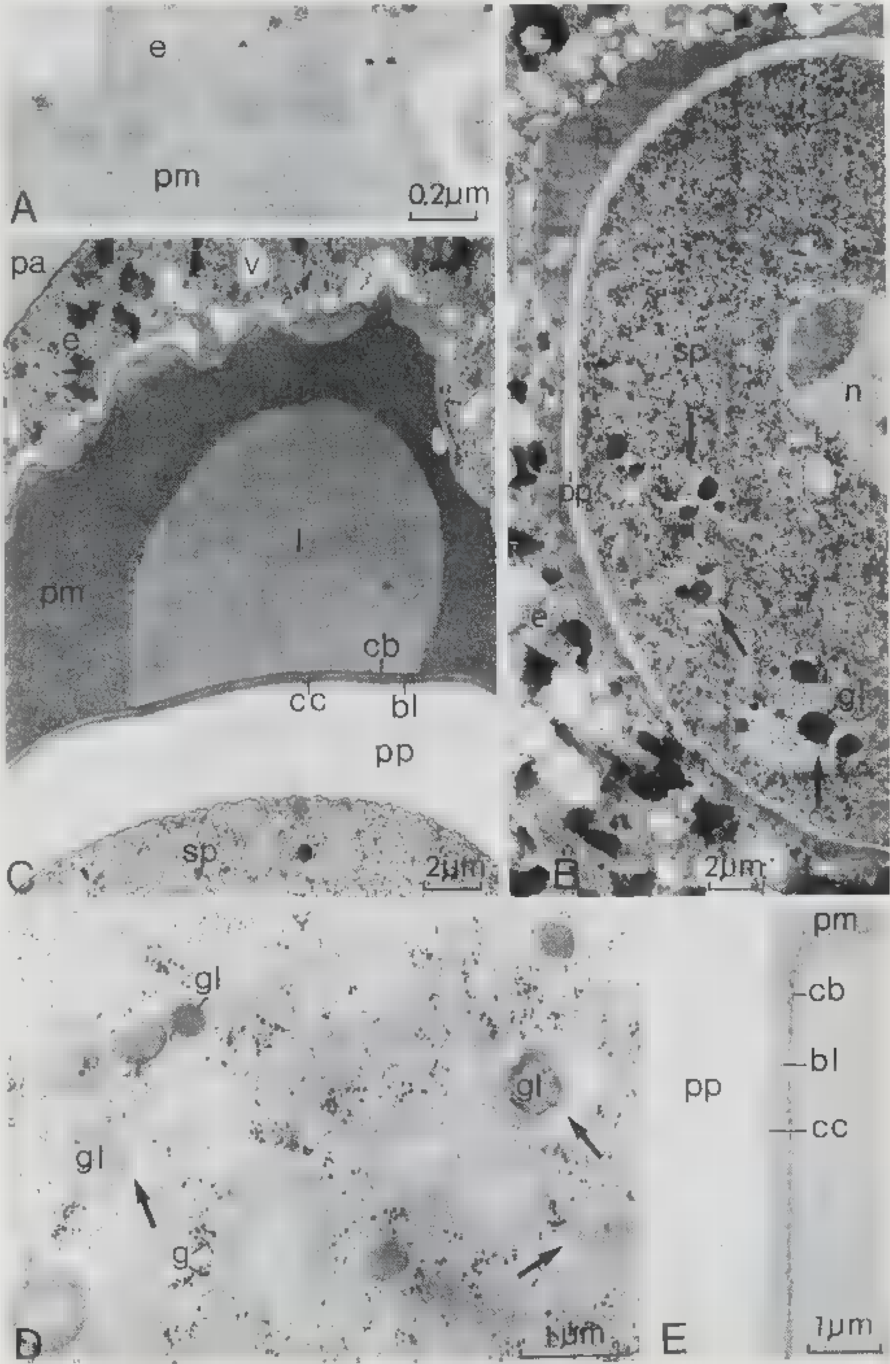
Planche VII — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène bs). — A. Détail de la paroi d'une ascospore en début de pigmentation (Patag). La masse interne d'une loupe de la périspore contient de nombreux grains de pigment, très fins (gf) alors qu'il y en a très

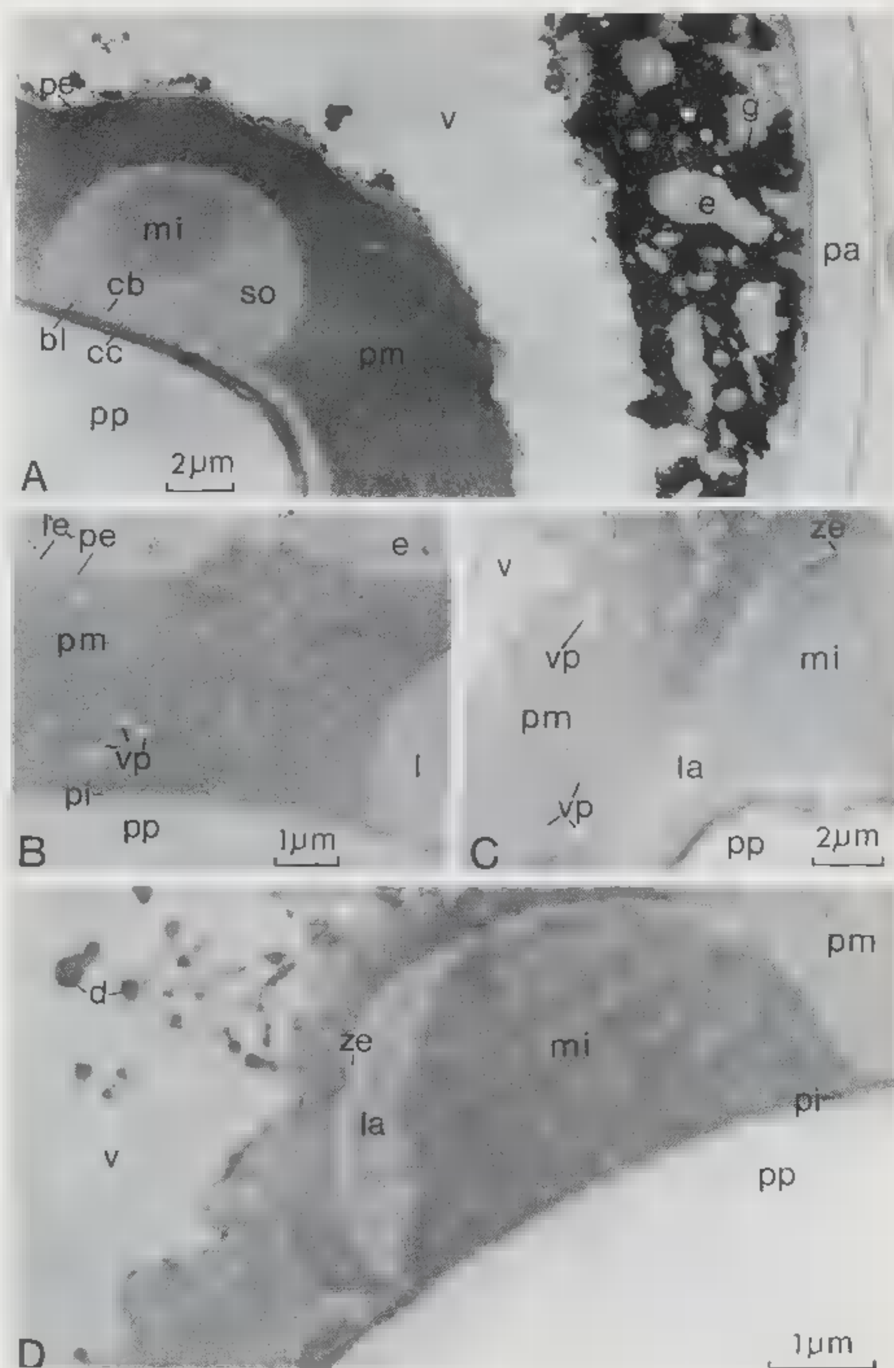
peu dans le lambeau de substance fondamentale (la). La couche castor (cc) et la couche pollux se pigmentent aussi. La lamelle noire (ln) est bien réactive sous la loupe mais n'est pas distincte ailleurs (flèche). — B. Détail du bord d'une loupe de la périspore d'une ascospore en cours de pigmentation (Patag). Dans la masse interne de la loupe les fins grains de pigment sont portés par des granules (gr) coalescents en une croûte vers la périphérie. Le lambeau de substance fondamentale de la loupe (la) contient de nombreux grains fins de pigment qui sont dispersés. La couche castor (cc) est bien pigmentée.

Plate VII — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Detail of the ascospore wall in an early stage of pigmentation (Patag). The internal part of a perispore lens contents many pigmented, very thin granules (gf) ; those are rather scarce in the shread of fundamental substance (la). Castor layer (cc) and pollux layer are also pigmented. The black sheath (ln) well reactive under the lens is not elsewhere distinct (arrow). — B. Detail of the border of a perispore lens in a pigmenting ascospore (Patag). The thin pigmented granules of the internal part of a lens are born on big granules (gr) which at the periphery, are fusing in a crust. In the shread of fundamental substance of the lens (la) there are numerous scattered thin pigmented granules. The castor layer (cc) is well pigmented.

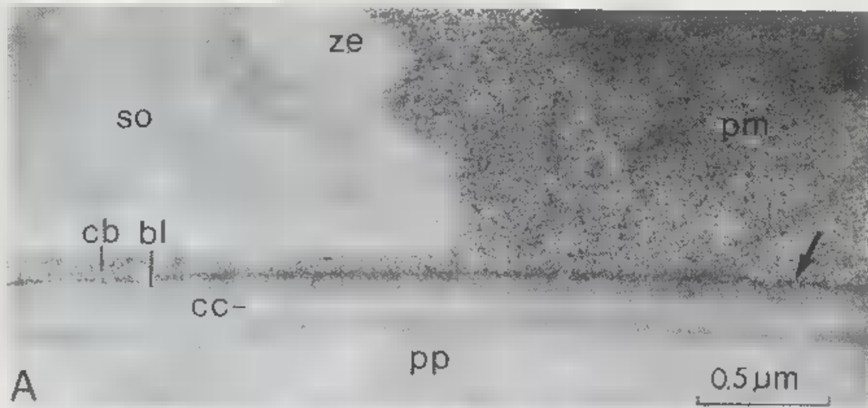
Planche VIII — *Ascobolus immersus*, mutant granuleux (gène b8). — A. Détail d'une loupe de la périspore d'une ascospore en cours de pigmentation (acétate d'uranyle, citrate de plomb). La technique de contraste ne fait apparaître que de courts bâtonnets de pigment à la périphérie de la masse interne de la loupe. — B. Détail de la périspore surmontant une loupe dans une ascospore en cours de pigmentation (Patag). Une vésicule volumineuse de la périspore (vp) contient des granules de pigment (gr). Dans la loupe la zone externe n'est pas pigmentée ; la masse interne montre des grains très fins portés par des granules qui, à la périphérie, sont associés en une sorte de croûte (cr). — C. Périspore avec loupe dans une ascospore mûre (Patag). Dans la masse interne de la loupe le pigment forme des cannelures (ca) très réactives ; celles-ci font défaut dans sa partie centrale (pc). Dans le lambeau de substance fondamentale (la) le pigment forme des granules (gr) ou des bâtonnets (b). La périspore elle-même n'est pas pigmentée, sa surface externe est très irrégulière. — D. Détail de VIIIC (Patag) : contact entre les cannelures de pigment (ca) de la masse interne de la loupe et les bâtonnets (b) et les granules (gr) de pigment d'un lambeau de substance fondamentale (la) de la loupe.

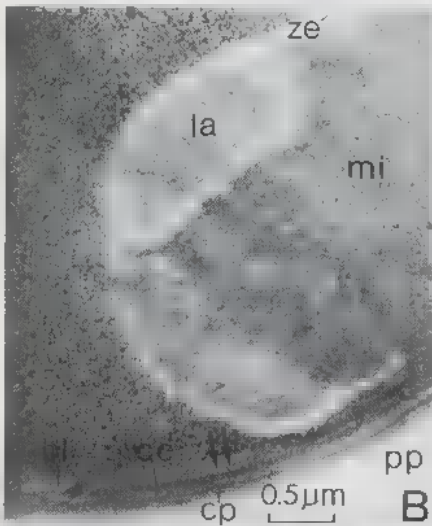
Plate VIII — *Ascobolus immersus*, granular mutant (b8 gene). — A. Detail of a perispore lens in a pigmenting ascopore (uranyl acetate, lead citrate). Only short rods of pigment appeared contrasted in the periphery of the internal part of the lens. — B. Detail of the perispore over a lens in a pigmenting ascospore (Patag). The perispore shows a big vesicle (vp) with pigmented granules (gr). The external part of the lens is unpigmented ; in the internal part very thin granules are born on bigger granules which at the periphery are fused in a sort of crust (cr). — C. Perispore with lens in a mature ascospore (Patag). In the internal part of the lens the pigment is disposed in reactive flutings (ca) ; these lack in the central part (pc). In the shread of fundamental substance the pigment is disposed either in granules (gr) or rodlets (b). The perispore is not pigmented ; its external surface is very irregular. — D. Detail of VIIIC (Patag) : contact between the pigmented flutings (ca) of the internal part of the lens with the rodlets (b) and the granules of pigment pertaining to a shread of fundamental substance of the lens (la).

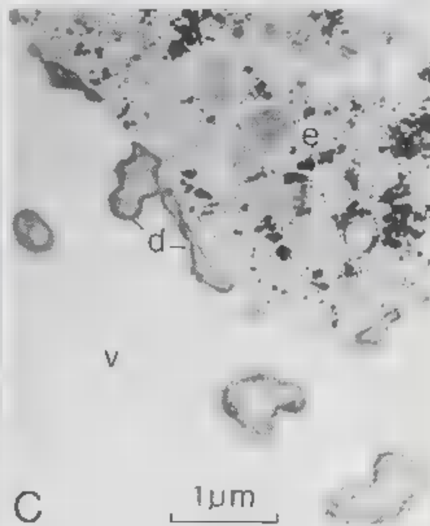

e
pm
0.2µm
A
pa
v
e
pm
l
cb
cc
bl
pp
sp
2µm
C
sp
n
pp
e
gl
2µm
B
gl
gl
gl
g
pp
pm
cb
bl
cc
1µm
D
E
1µm

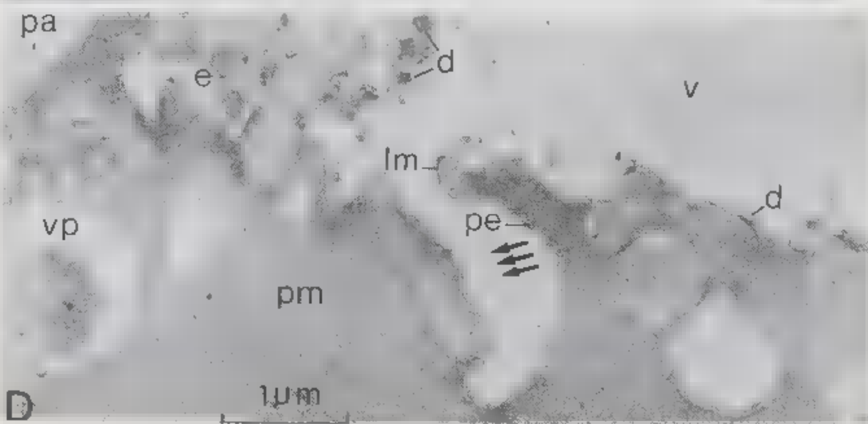


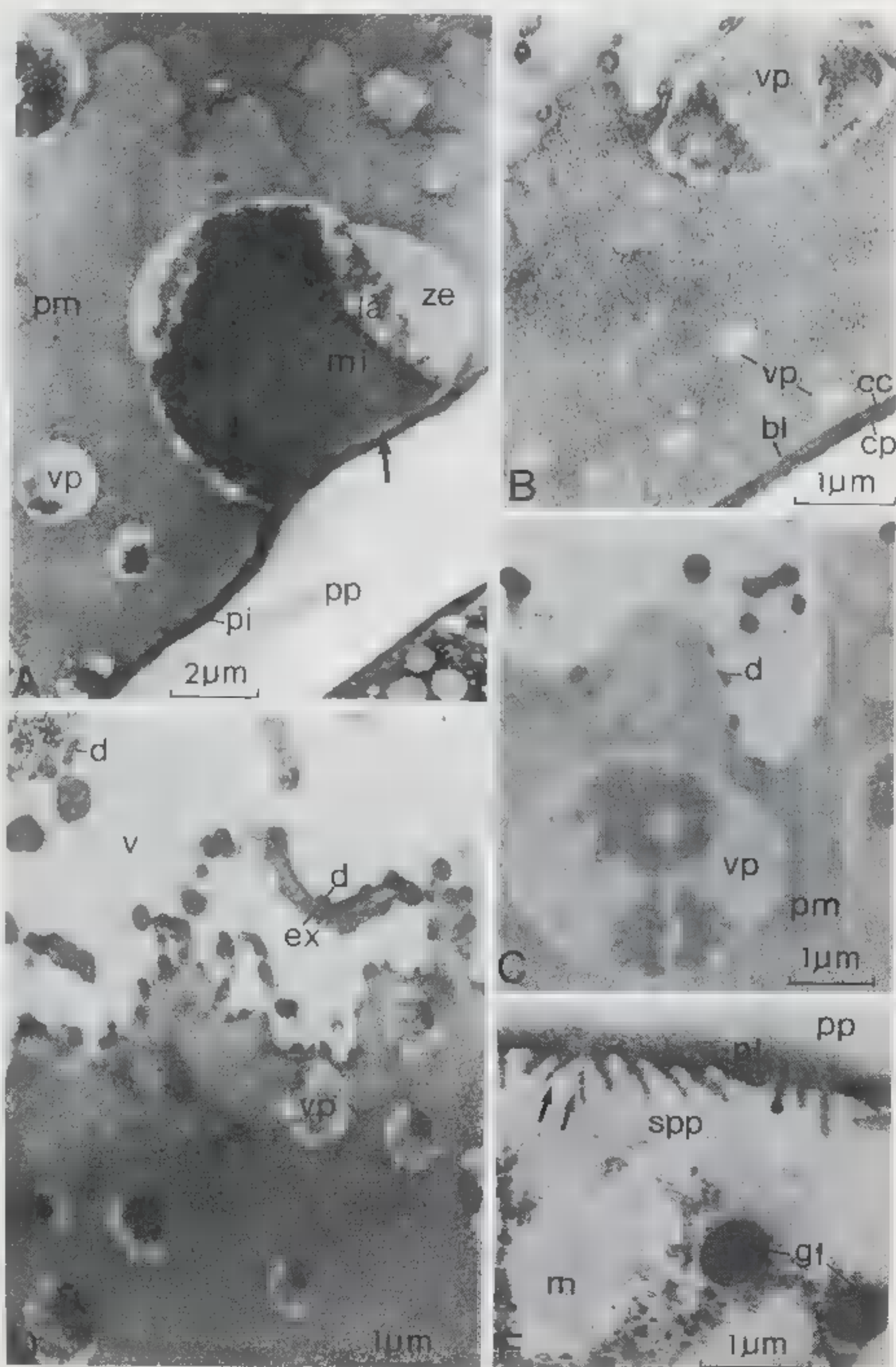
A
pe
v
g
e
mi
pa
cb
so
bl
cc
pm
pp
2µm
B
le
pe
e
pm
vp
pi
pp
l
1µm
C
v
ze
vp
mi
pm
la
vp
pp
2µm
D
pm
d
ze
mi
la
pi
v
pp
1µm

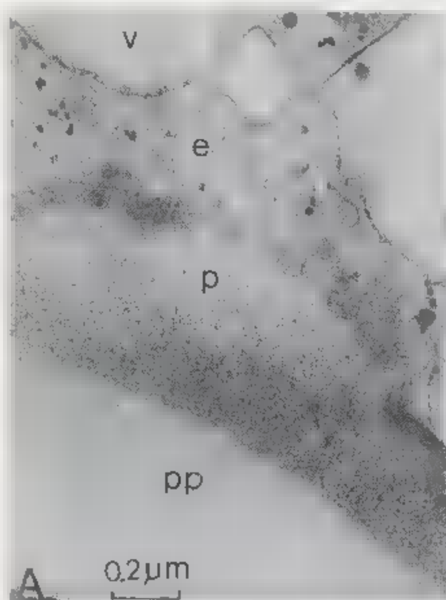

ze
so
pm
cb
bl
cc
pp
A
0.5 µm

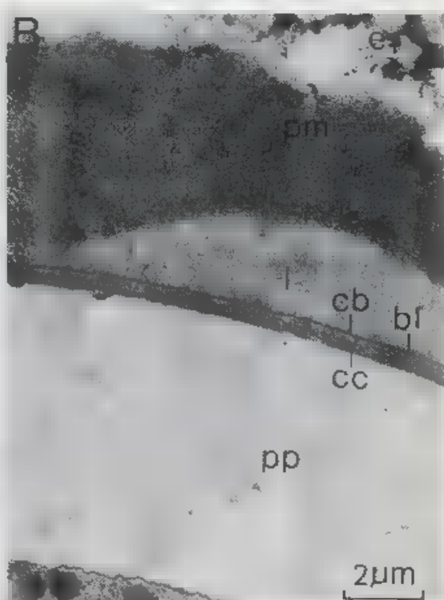

ze
la
mi
cc
pp
cp
0.5µm
B

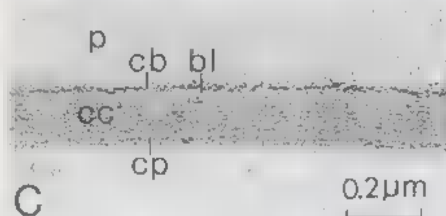

e
d
v
C
1µm

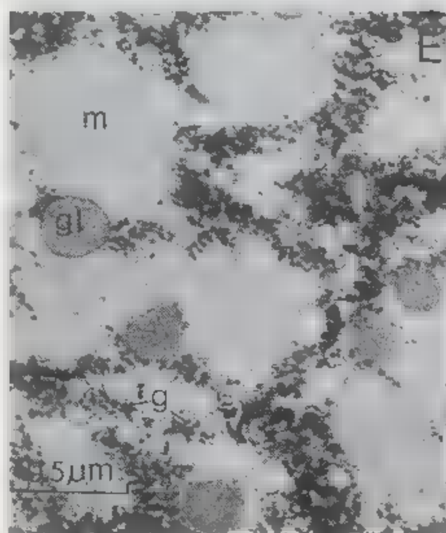

pa
e
d
v
lm
d
vp
pe
pm
D
1µm

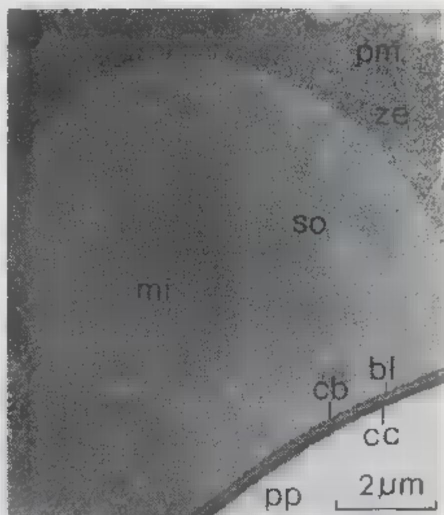

pm
la
ze
mi
vp
pp
pi
A
2µm
vp
vp
cc
bl
cp
B
1µm
d
vp
pm
C
1µm
d
v
d
ex
vp
1µm
pp
pl
spp
gl
m
1µm

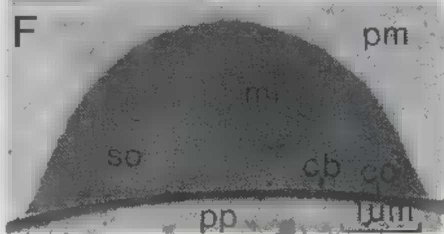

v
e
p
pp
0,2µm
A

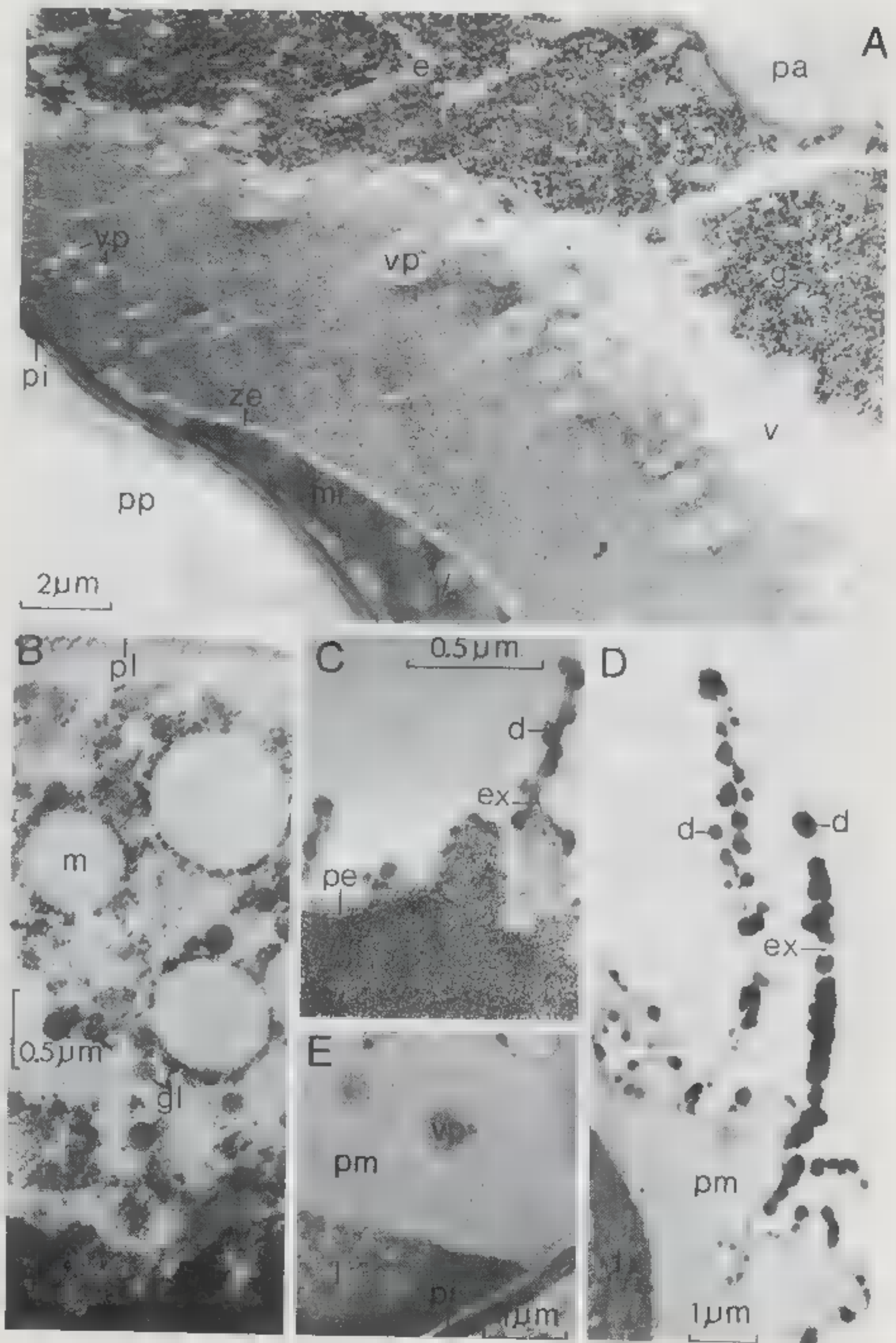

B
e
pm
l
cb
bl
cc
pp
2µm

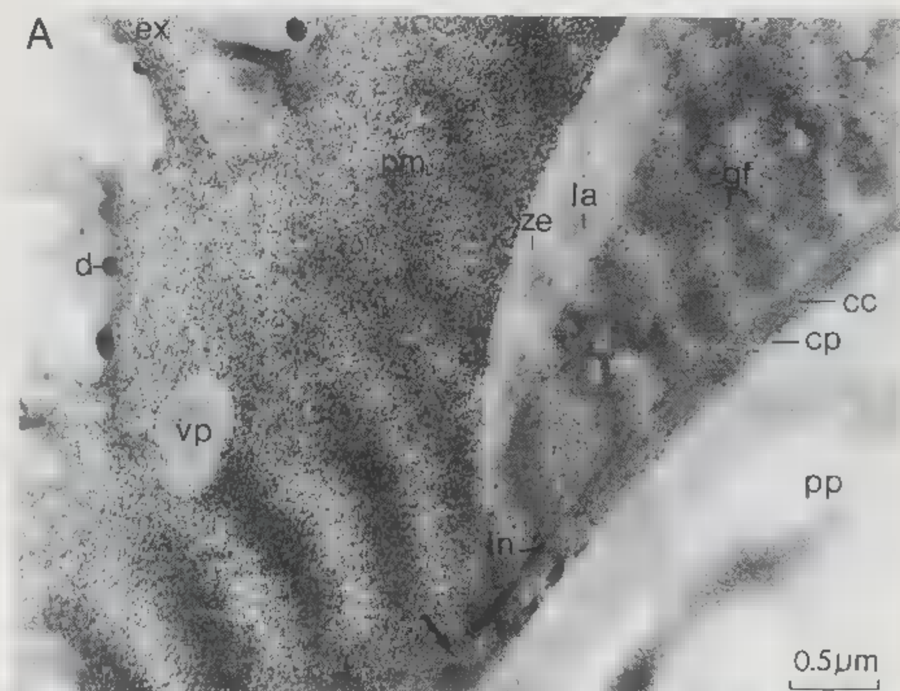

p
cb
bl
cc
cp
C
0,2µm

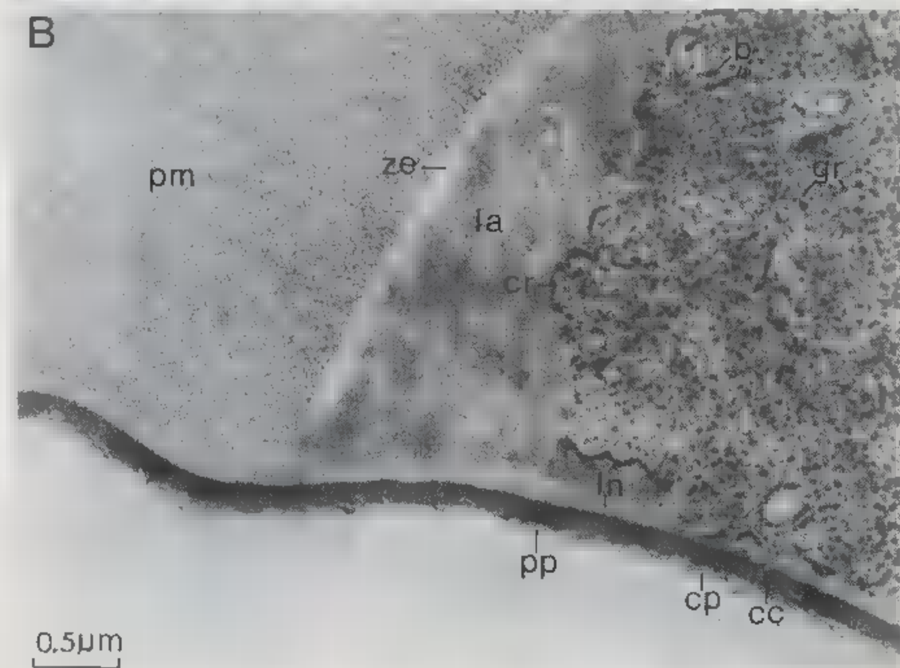

E
m
gl
g
1,5µm

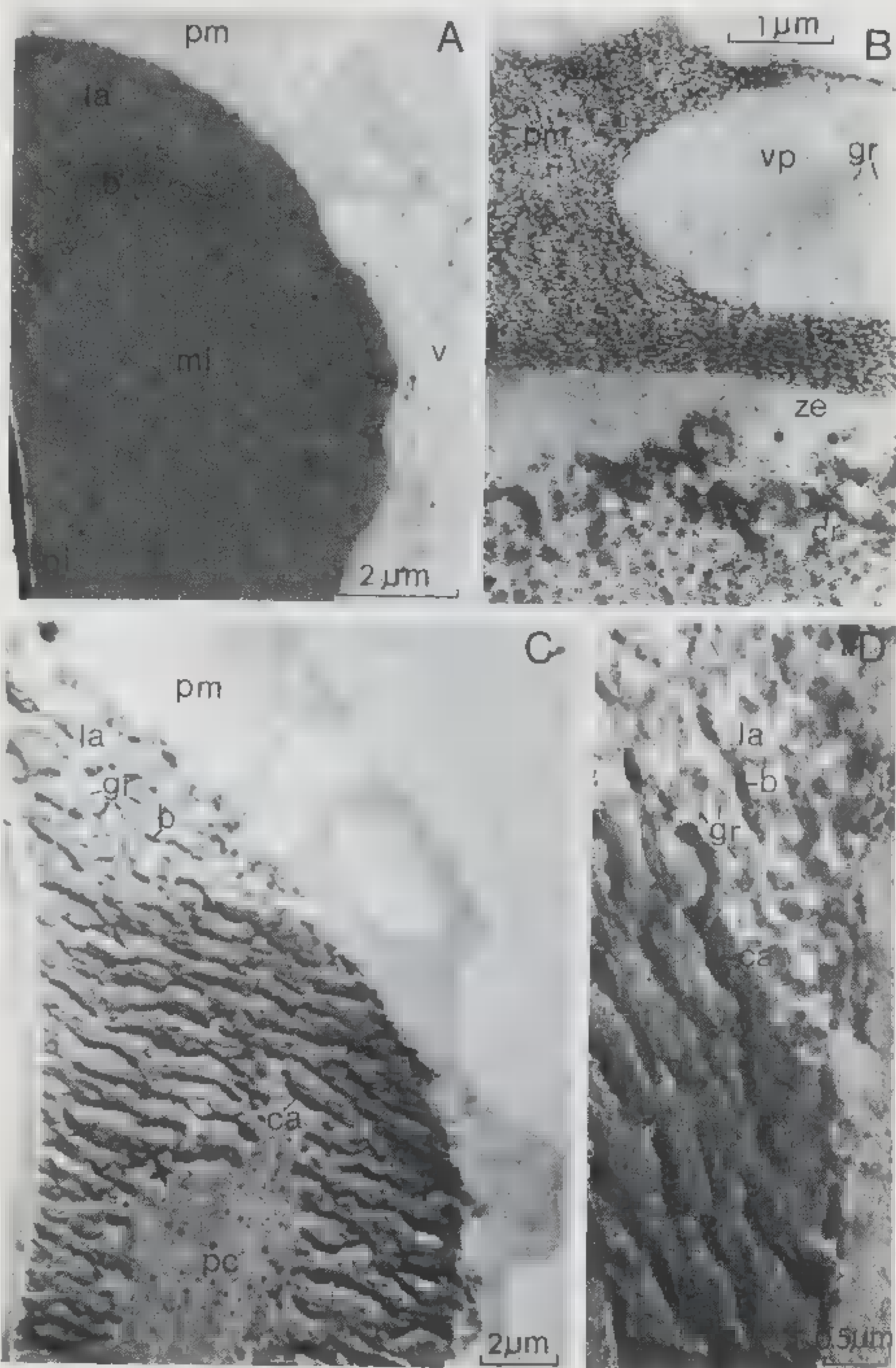

pm
ze
so
mi
bl
cb
cc
pp
2µm


F
pm
so
cb
pp
1µm


A
e
pa
vp
vp
g
pi
ze
v
pp
mr
2µm
B
pl
m
0.5µm
gl
C
0.5µm
d
ex
pe
D
d
d
ex
pm
1µm
E
vp
pm
pi
1µm


A
ex
d
pm
la
ze
gf
cc
cp
vp
pp
ln
0.5μm


B
b
pm
ze
gr
la
cr
ln
pp
cp
cc
0.5μm


A
pm
la
b
mi
v
bi
2 µm
B
1 µm
pm
vp
gr
ze
cr
C
pm
la
gr
b
ca
pc
2µm
D
la
b
gr
ca
0,5µm

CONTRÔLE MORPHOGÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION DES SCLÉROTES DE *SCLEROTINIA FRUCTIGENA* : II - ÉTUDES CYTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES

par L. NAJIM*

RÉSUMÉ — Le « shift-down » de température permet de suivre aisément le développement de tous les stades de différenciation des sclérotes, des primordia à la maturation, facilitant ainsi des études cytologiques et ultrastructurales sur les primordia

Les primordia de sclérotes du *Sclerotinia fructigena* montrent un développement important des hyphes intra-hyphales, une mélanisation des hyphes principales et des transformations ultrastructurales de quelques organites, particulièrement le système vacuolaire, les microcorpuscules (« microbodies »), les noyaux, le reticulum endoplasmique, les accumulations fibrillaires et les mitochondries.

Cette réorganisation structurale durant la différenciation des primordia va dans le sens d'une recherche d'un nouvel équilibre physiologique, c'est-à-dire, d'un état de croissance active représenté par l'hyphe végétative vers un état de vie au ralenti : le sclérote.

SUMMARY - The shift-down of temperature permits to follow easily the development and differentiation of all states of sclerotia : from primordia to a maturation and facilitates cytological and ultrastructural studies.

Sclerotial primordia of *Sclerotinia fructigena* show an important development of intra-hyphal hyphae. a melanization of principal hyphae and ultrastructural transformations of some organels, particularly vacuolary system, microbodies, nuclei, endoplasmic reticulum, fibrillar accumulations and mitochondria.

This structural reorganization during primordia differentiation are in the way of a research of a novel equilibrium : that is to say from one state with a high level of rate growth represented by the vegetative hyphae to a state of slow rate of growth : the sclerotia.

MOTS CLÉS : *Sclerotinia fructigena*, sclérote, primordia, hyphes principales, hyphes intra-hyphales, équilibre physiologique, mélanines.

* Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences de Rabat, avenue Ibn Babota, B.P. 1014, Rabat - MAROC.

INTRODUCTION

La morphogenèse et le développement des sclérotes ont été étudiés par divers auteurs (WILLETTS, 1968a-b, 1969, 1972 ; CHET & HENIS, 1975).

Sur le plan morphogénétique, les sclérotes sont formés de deux parties : le cortex et la médulla. Le cortex est feutré et plus ou moins hyalin, il entoure la médulla qui est constituée d'un ensemble d'hyphes agglutinées les unes contre les autres et qui sont riches en substances nutritives (WILLETTS, 1972, 1978).

En général, leur développement se déroule en trois étapes successives : une étape d'initiation qui consiste en une différenciation des primordia, suivie d'une étape caractérisée par un accroissement de la taille et enfin une étape de maturation où l'on distingue nettement le cortex de la médulla.

Les différentes étapes sont conditionnées par les facteurs trophiques et physiques qui jouent un rôle déterminant dans le contrôle de la différenciation des sclérotes. Cette différenciation s'accompagne de changements physiologiques et cytologiques importants, car ils marquent le passage à la vie au ralenti.

Dans les conditions de croissance normales, les sclérotes de *Sclerotinia fructigena* commencent leur différenciation à la fin de la conidiogenèse, et plus particulièrement de la macroconidiogenèse. En effet, dans les conditions naturelles, la fin de l'étape de la macroconidiogenèse constitue le point de départ de la différenciation des sclérotes.

Toutefois, l'étape de la macroconidiogenèse n'est pas nécessairement obligatoire, car avec le système de transfert (NAJIM, 1987) on peut induire une différenciation absolue de sclérotes en utilisant seulement les facteurs physiques comme stimuli.

Les données sur la différenciation des sclérotes étant acquises, nous les avons utilisées dans un double but ; d'une part pour étudier les changements morphologiques et cytologiques qui accompagnent la différenciation des sclérotes tout en les comparant parallèlement avec les structures déjà observées de l'hyphe végétative (NAJIM & TURIAN, 1979a) et de l'hyphe conidiogène (NAJIM & TURIAN, 1979b). Ce travail permettra de mieux comprendre les phénomènes de passage d'un état de croissance active à un état de vie au ralenti, qui peut durer plusieurs années.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches et méthodes culturales

La souche de *Sclerotinia fructigena* utilisée a été déjà décrite (NAJIM, 1987). Toutefois, l'induction des primordia a été suivie sur des cultures ayant poussé pendant 7 jours à l'obscurité à 23°C, puis transférées durant 48 ou 96 h à 3°C.

Microscopie électronique à balayage

Le matériel fongique est fixé selon la méthode décrite pour l'étude de l'ultrastructure de l'hyphe végétative du *S. fructigena* (NAJIM & TURIAN, 1979a). Toutefois, après la déshydratation à l'acétone (25, 50, 75 et 100%), les sclérotes sont sectionnés puis montés directement sur un porte-objet et couverts par une fine pellicule d'or pour assurer la conductivité.

Microscopie électronique à transmission

Des primordia de sclérotes, dont les stades de développement sont déterminés au microscope optique, sont prélevés et fixés pour la microscopie électronique à transmission.

Les primordia sont fixés de la même façon que les hyphes végétatives ; toutefois, la durée de fixation est étendue à 2 h pour la glutaraldéhyde à 2%, et 2 h pour le tétroxyde d'osmium à 2% en raison de la forte agglutination des hyphes.

Le matériel est déshydraté à l'alcool (25, 50,75 et 100%) et enrobé dans du SPURR (1969).

Les coupes subissent successivement une double coloration d'abord à l'acétate d'uranyle à 2% en solution aqueuse et puis au citrate de plomb selon la méthode de REYNOLDS (1963).

RÉSULTATS

Morphogenèse et différenciation des sclérotes

Une vue d'ensemble d'un sclérote de 4 mm, sectionné transversalement permet de distinguer le cortex et une zone centrale compacte, la médulla (Fig. 1).

Le cortex est constitué de plusieurs zones plus ou moins distinctes ; on y distingue une évolution structurale de l'extérieur vers l'intérieur (Figs. 2, 3). La partie externe du cortex est feutrée et l'organisation des hyphes y est très lâche, elles se croisent et s'entrecroisent formant ainsi des alvéoles ou des méats et donnant un aspect spongieux aux cortex (Fig. 2). La partie interne du cortex est constituée de cordons qui sont formés de trois ou quatre hyphes accolées longitudinalement (Fig. 3). Les cordons s'enchevêtrent également dans un sens ou dans un autre. Il n'existe pas de forme structurale particulière permettant de distinguer le cortex de la médulla ; toutefois, les hyphes s'organisent dans cette limite en un prosenchyme (Fig. 4). Par contre, les sclérotes, qui se développent dans le substratum, différencient un cortex réduit avec des hyphes aplaties qui s'entrecroisent et qui sont mélanisées (Fig. 5).

La médulla forme la partie centrale du sclérote, dont les hyphes sont mélanisées et structurées en un pseudoparenchyme (Fig. 4). Ces hyphes sont par ailleurs fortement liées entre elles par un ciment inter-hyphal.

Différenciation des primordia de sclérotes

Après 48 h de transfert des cultures végétatives à 3°C, les primordia commencent leur différenciation, ces derniers forment en premier le cortex (Fig. 6). Ces hyphes se croisent à plusieurs endroits, et sécrètent des mucopolysaccharides sous forme de fibrilles. Ces fibrilles maintiennent les hyphes reliées entre elles (Fig. 6). En outre, un certain nombre de transformations sont notées dans ces hyphes : une augmentation de la ramification (Fig. 7a), un épaississement de la paroi (Fig. 7b) et une mélanisation qui peut aussi toucher le cytoplasme (Fig. 7a,b).

Après 4 jours de transfert à 3°C, les organites des hyphes situées dans la zone intermédiaire entre le cortex et la médulla se remplissent d'un ciment en apparence formé de mélanines. Ces hyphes mélanisées et limitrophes à la médulla forment la barrière protectrice de cette dernière.

La médulla des primordia de sclérotes se différencie progressivement, les hyphes s'accolent à l'aide du ciment inter-hyphal sécrété par ces dernières et les parois s'épaississent fortement (Fig. 8). Par ailleurs, de nombreuses hyphes intra-hyphales sont localisées dans la médulla des primordia. Les structures des hyphes intra-hyphales sont en général préservées, alors que celles des hyphes principales sont entièrement colmatées par une substance opaque (Figs. 8-13).

Ultrastructure des organites et des différentes formations

Le système vacuolaire — Le système vacuolaire se développe dans les hyphes du cortex et dans celles de la médulla, il est formé de petites vacuoles à contenu très dense aux électrons de diamètre variable entre 1 et 2 μm (Figs. 10-12), et de vacuoles plus larges et à contenu moins dense aux électrons (Figs. 25-26). Dans le cas général, l'origine du système vacuolaire est lié au système réticulaire ; dans le cas du *S. fructigena*, il apparaît que la membrane nucléaire participe à l'élaboration des vacuoles (Figs. 22, 24).

En effet, certaines vacuoles d'origine nucléaire, dès les premiers stades de leur formation, peuvent séquestrer des organites (Fig. 23) et du matériel cytoplasmique (Figs. 16, 22, 24) et les « digérer » progressivement.

Cette digestion des organites, qui va dans le sens d'une recherche d'un nouvel équilibre structurel, se fait aussi par l'intermédiaire de vacuoles autophagiques (Fig. 25).

Les mitochondries sont progressivement digérées par les vacuoles autophagiques (Fig. 25), laissant apparaître après la lyse des structures de type myélinique (Fig. 26).

Les microcorpuscules (« Microbodies ») — Les microcorpuscules dans les hyphes de la médulla ont une membrane unique et une matrice dense finement granulaire, leur aspect général est tout à fait identique à ceux déjà décrits dans les hyphes végétatives, dans les macroconidies et les primordia de sclérotes (NAJIM & TURIAN, 1979b ; NAJIM & al., 1979).

A ce stade de différenciation, les microcorpuscules ne sont pas associés aux globules lipidiques (Fig. 12) qui constituent la principale source de réserve.

Les noyaux — Dès l'initiation des sclérotes, les noyaux (Figs. 8-9-13) deviennent progressivement sphériques et contiennent un nucléole fibrillo-granulaire (Fig. 8), et quelquefois des membranes intranucléaires (NAJIM, 1982a). Dans les hyphes marginales de la médulla, le déplacement des organites continue à se faire malgré la baisse de température. En effet, les noyaux peuvent encore migrer à travers un pore septal de 0.2 à 0.3 μm de diamètre (Figs. 15, 16).

Les septa — Comparé à l'hyphe végétative, où les septa ne sont pas épais, dans les sclérotes ces formations s'épaississent davantage et contiennent tout au long quelques granulations (Fig. 16), apparemment du même type que celles décrites dans les épaississements de paroi de *S. fructigena* (NAJIM 1982 b,c).

Reticulum endoplasmique — La chute de température fait subir au système endomembranaire des transformations importantes : le réticulum endoplasmique notamment s'organise d'une façon similaire à un appareil de Golgi (Figs. 17, 18). Les saccules du réticulum endoplasmique lisse s'empilent les uns sur les autres ; on peut dénombrer jusqu'à 8 saccules pour cet ensemble réticulaire à la figure 17.

Les extrémités de ces saccules sont digitées à la manière des dictyosomes (Figs. 17, 18). Sur ces microphotographies, il n'apparaît pas de différences d'épaisseur entre les deux membranes d'un même saccule (face supérieure et face inférieure).

Accumulations fibrillaires — Des formations de microfilaments sont abondantes dans les primordia de sclérotes (Figs. 19, 20). Ces microfilaments ont un diamètre de 60 à 70 Å, ils sont groupés en micro-réseaux et montrent une organisation cristalline en coupe transversale (Fig. 20).

Les mitochondries et les formations de figures myéliniques — Dans les primordia de sclérotes, les mitochondries ont une matrice moins dense aux électrons et présentent peu de crêtes (Fig. 9), elles sont comparables à celles des macroconidies (NAJIM, 1979). Certaines de ces mitochrondries ont des crêtes qui se transforment en corps myéliniques (ou en « whorls ») (Figs. 14, 21).

DISCUSSION

La biogenèse est dépendante de la masse des hyphes produites en culture et notamment des nombreuses hyphes intra-hyphales qui sont générées et qui caractérisent la formation d'une part de la médulla et d'autre part du cortex. Les hyphes intra-hyphales ont été aussi observées chez le mutant « clock » de *Neurospora* (LOWRY & SUSSMAN, 1966), chez le *Linderina* (CHAN & STEPHEN, 1967) ou encore chez le *Trichophyton* (FORLEY & al., 1975) ; selon ces auteurs, ce type de développement est lié à la regénération des champignons.

Cependant, ce phénomène apparaît comme déterminant dans la différenciation des sclérotes. En effet, sur le plan cytologique les hyphes intra-hyphales sont protégées et peuvent assurer la pérennité de ce champignon ou en quelque sorte la regénération de cette espèce. Le mode de formation de ces hyphes intra-hyphales reste en partie obscure ; selon CALONGE (1968) ces dernières se développeraient à partir des septa de *S. fructigena* ou encore à la suite d'anastomoses entre les différentes hyphes (CALONGE, 1968 ; HOFFMAN, 1972). Nos résultats tendent aussi à confirmer ces hypothèses.

Sur le plan cytologique, les hyphes intra-hyphales sont baignées dans un ciment probablement constitué de mélanines et se différencient des autres par leur paroi épaisse. L'origine de ce ciment serait probablement lié aux petites vacuoles au contenu dense aux électrons.

Ce ciment peut, en effet, assurer la protection des hyphes intra-hyphales qui pourront assurer la regénération de cette espèce.

La biosynthèse des polysaccharides pariétaux et extra-pariétaux est fortement activée durant la différenciation des sclérotes ; elle n'est donc pas inhibée par la chute de la température. Ceci a d'ailleurs été confirmé par DARGENT & al. (1984).

Le rôle des mélanines est probablement de protéger les structures qui persistent dans les sclérotes et leur accumulation paraît être liée à l'activation des phénoloxydases (tyrosinases) au stade primordia de sclérotes (WONG & WILLETTS, 1974).

Sur le milieu de croissance MCA, les hyphes végétatives présentent à leur apex de gros globules lipidiques fortement osmiophiles qui seraient principalement composés d'acides gras insaturés (NAJIM & TURIAN, 1979a). Par opposition, les hyphes intra-hyphales des primordia de sclérotes, formés sur le même milieu MCA, contiennent des globules lipidiques dont la densité électronique est relativement fai-

ble. On pourrait donc supposer que les globules lipidiques des sclérotes sont composés d'acides gras saturés.

Dans les primordia, ces lipides semblent constituer la principale source de réserve ; toutefois, à ce stade de développement, on n'observe pas de contiguïté entre les microcorpuscules (« microbodies ») et les globules lipidiques. Les microcorpuscules, chez le *S. fructigena*, deviennent proéminents dans les primordia de sclérotes (NAJIM & al., 1979).

Sur le plan physiologique, CHET & HENIS (1975) ont mis en évidence un cycle glyoxylique lors de la genèse des sclérotes chez le *Sclerotinia rolfsii*. Cependant, CHET & al. (1972) et MURAKAWA & al. (1975) notent que l'activité de la péroxydase chez le *Sclerotinia* augmente du stade primordia à la maturation.

Ainsi, les microcorpuscules observés dans les primordia seraient probablement des péroxysomes du fait même de la non contiguïté avec les globules lipidiques. Par contre, il n'est pas exclu que lors de la germination des sclérotes, et avec les lipides comme principale source de carbone, que l'activité glyoxylique n'apparaisse pas.

La modification structurelle touchant le réticulum endoplasmique qui s'organise sous la forme d'un dictyosome est décrite pour la première fois ; cette structure semble être typique aux sclérotes. Probablement qu'à ce stade de différenciation, les empilements de saccules du réticulum endoplasmique lisse doiven jouer un rôle dans les sécrétions et les synthèses.

Parallèlement, des formations de microfilaments sont observées dans les hyphes où la croissance est limitée. A l'opposé, dans les hyphes végétatives en pleine croissance, ces formations para-cristallines se présentent rarement. Ces formations semblent être dissociées dans le cytoplasme des hyphes végétatives sous la forme de microfilaments de 70 Å de diamètre et ces derniers, en association avec les microtubules (cytoplasmiques ou nucléaires), joueraient probablement un rôle dans le déplacement des organites (Figs. 16, 17) ou dans les courants protoplasmiques. En outre, des formations de ce type s'accumulent dans les hyphes végétatives placées dans des conditions limitantes pour la croissance (BECK & al., 1970 ; ALLEN & al., 1974 ; TANAKA & MIZUGANA, 1974 ; OULEVEY & al., 1978) et dans certains cas dans les noyaux (BECK & al., 1970 ; VAN WINKLE & al., 1971 ; ALLEN & al., 1974 ; TANAKA & MIZUNAGA, 1974).

En effet, dans les hyphes végétatives en pleine croissance (MCA), on trouve peu de ces formations para-cristallines, mais des microfilaments dissociés (NAJIM & TURIAN, 1979a ; NAJIM, 1979) ; ce qui nous amène à penser que les courants protoplasmiques sont liés à la dissociation partielle de formations para-cristallines en microfilaments ; notons que ces derniers ont été identifiés comme étant de l'actine chez le *Neurospora* (ALLEN & SUSSMAN, 1978 ; SIKORA & MARZLOUF, 1982).

Les mitochondries, dans les primordia de sclérotes, ont tendance à présenter des corps myéliniques ou « worls ». Selon BECK & GREENAWALT (1976), ces formations en « worls » pourraient être constituées de phospolipides.

CONCLUSION

De nombreuses transformations ultrastructurales sont mises en évidence lors de la différenciation des primordia de sclérotes :

— la paroi des hyphes s'épaissit, et la synthèse pariétale n'est pas inhibée, ce qui favorise la septation et le développement des hyphes intra-hyphales ;

— les parois de certaines hyphes du cortex subissent une mélanisation, cette dernière pourrait prévenir la dessiccation des sclérotes ;

— les hyphes principales contenant les hyphes intra-hyphales subissent un colmatage de leurs structures, par un ciment à forte densité électronique, ce dernier pourrait être constitué de mélanines. Par ailleurs, le système endomembranaire, subit aussi des transformations :

- empilement de saccules de réticulum endoplasmique ;
- présence de deux types de vacuoles ;
- participation de l'enveloppe nucléaire à la formation du système vacuolaire.

Certains noyaux présentent des invaginations de membranes (NAJIM, 1982a), par contre d'autres deviennent quiescents et sphériques. Les mitochondries ont moins de crêtes, elles présentent des structures similaires aux corps myéliniques.

En conclusion, toutes ces transformations montrent qu'un nouvel équilibre physiologique se crée, avec une élimination des organites en excès (activité du système vacuolaire, colmatage des hyphes principales) et la préservation d'un minimum de structures vivantes (restructuration du système endomembranaire, des noyaux et des hyphes intra-hyphales).

La biogenèse des sclérotes peut donc se résumer comme suit : une condensation de structures vivantes et une élimination de la matière en excès par voie lytique.

REFERENCES

ALLEN E.D., LOWRY S.A. and SUSSMAN A.S., 1974 — Accumulation of microfilaments in a colonial mutant of *Neurospora crassa*. *J. Ultrastruct. Res.* 48 : 455-465.

ALLEN E.D. and SUSSMAN A.S., 1978 — Presence of an actin-like protein in mycelium of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* 135 : 713-716.

BECK D.P., DECKER G.L. and GREENAWALT J.W., 1970 — Ultrastructure of striated inclusion in *Neurospora*. *J. Ultrastruct. Res.* 33 : 249-251.

BECK D.P. and GREENAWALT J.W., 1976 — Biogenesis of mitochondrial membranes in *Neurospora crassa* during cellular differentiation. *J. Gen. Microbiol.* 97 : 97-110.

CALONGE F.D., 1968 — Origin and development of intra-hyphal hyphae in *Sclerotinia fructigena*. *Mycologia* 60 : 932-942.

CHAN C. and STEPHEN R.C., 1967 — Intra-hyphal hyphae in the genus *Linderina*. *Canad J. Bot.* 45 : 1995-1998.

CHET I., RETIG N. and HENIS Y., 1972 — Changes in total soluble proteins and in some enzymes during morphogenesis of *Sclerotium rolfsii*. *J. Microbiol.* 72 : 451-456.

CHET I. and HENIS Y., 1975 — Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annual Rev. Phytopathol.* 13 : 169-192.

DARGENT R., CHAVANT L., FONVIELLE J.-L. et WOLF C., 1984 — Influence d'un effecteur physique : la température sur l'ultrastructure de l'*Aspergillus ochraceus*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér III*, 299 : 831-836.

FORLAY J.F., JERSILD R.A. and NIEDERPRUEM D.J., 1975 — Origin and ultrastructure of intra-hyphae in *Tricophyton terrestre* and *T. rubrum*. *Arch. Microbiol.* 106 : 195-200.

HOFFMAN G.P., 1972 — Heterokaryose bei *Monilia fructigena*. *Phytopathol. Z.* 73 : 326-340.

LOWRY R.J. and SUSSMAN A.S., 1966 — Intra-hyphal hyphae in « Clock » mutant of *Neurospora*. *Mycologia* 58 : 541-548.

MURAKAWA S., FUNAKAWA S. and SATOMURA Y., 1975 — Role of sclerin on morphogenesis on *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (including *S. libertiana* Fuckel). *Agric. Biol. Chem.* 39 : 645-650.

NAJIM L., 1979 — Contrôle morphogénétique et études ultrastructurales d'une moisissure, le *Sclerotinia fructigena* (Aderh-Ruhl) agent de la moniliose des arbres fruitiers. Swit., University of Geneva, n° 1926.

NAJIM L., ORTEGA-PEREZ R., VANDERHAGUE F. and TURIAN G., 1979 — Identification of microbodies as peroxysomes in *Sclerotinia fructigena* (Aderh-Ruhl) by cytochemistry and isopyonic centrifugation. *Proc. Roy. Microscop. Soc.* 14 : 4.

NAJIM L. et TURIAN G., 1979a — Ultrastructure de l'hyphe végétative de *Sclerotinia fructigena Canad. J. Bot.* 57 : 1299-1313.

NAJIM L. and TURIAN G., 1979b — Conidiogenous loss of structurofunctional polarity in the hyphal tips of *Sclerotinia fructigena*. *Eur. J. Cell Biol.* 20 : 24-27.

NAJIM L., 1982a — Nuclear membrane behaviour in *Sclerotinia fructigena*. *Microbios Letters* 22 : 85-97.

NAJIM L., 1982b — Localization of microvesicles in Fungus cell wall. I. In germinating conidia of *Sclerotinia fructigena*. *Microbios Letters* 22 : 107-115.

NAJIM L., 1982c — Localization of microvesicles in fungus cell wall. II. Relation to pathogenesis. *Microbios Letters* 22 : 143-149.

NAJIM L., 1987 — Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* : I. Etudes physiologiques. *Cryptogamie, Mycol.* 8 : 209-217.

OULEVEY N., DICKER J.W. and TURIAN G., 1978 — Striated inclusion and defective mitochondria in the restricted form of the « amycelial » mutant of *Neurospora crassa*. *Experientia* 34 : 840.

REYNOLDS E.S., 1963 — The use of lead acetate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-212.

SIKORA L. and MARZLOUF G.A., 1982 — Identification and isolation of actin from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 128 : 439-445.

SPURR A.R., 1969 — A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26 : 31-43.

TANAKA K. and MIZUNAGA T., 1974 — Striated and crystalline inclusions in the nuclei and cytoplasm of intact yeast protolasts. *J. Ultrastruct. Res.* 48 : 124-127.

VAN WINKLE W.B., BIESELE J.J. and WAGNER R.P., 1971 — The mitotic apparatus of *Neurospora crassa*. *Canad. J. Genet. Cytol.* 13 : 873-888.

WILLETTS H.J., 1968a — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. I. In culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51 : 625-632.

WILLETTS H.J., 1968b — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. II. In fruits. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 51 : 633-642.

WILLETTS H.J., 1969 — The development of stromata of *Sclerotinia fructigena* and related species. III. Further observations and conclusions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 52 : 309-314.

WILLETTS H.J., 1972 — The morphogenesis and possible evolutionary origins of fungal sclerotia. *Biol. Rev.* 47 : 515-536.

WILLETTS H.J., 1978 — Sclerotium formation. *In* : SMITH J.E. & BERRY D.R., *The Filamentous Fungi*, Vol. III. London, E. Arnold : 197-211.

WONG A.L. and WILLETTS H.J., 1974 — Polyacrylamide-gel electrophoresis of enzymes during morphogenesis of Sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Gen. Microbiol.* 103 : 77-83.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES FIGURES

Cih	ciment inter-hyphal	Mb	microcorpuscule
COR	cordon	ME	médulla
CO	cortex	N	noyau
F	faisceau de microfilaments	n	nucléole
g	granulations	P	paroi
H	hyphe mélanisée	Re	réticulum endoplasmique
HM	automélanisation	S	septum
L	globule lipidique	v	vacuole
M	mitochondrie	W	corps de Woronin

ABBREVIATIONS USED IN FIGURES

Cih	inter-hyphal cement	Mb	microbodies
COR	strand	ME	medulla
CO	cortex	N	nuclei
F	bundle of microfilaments	n	nucleoli
g	granulations	P	wall
H	melanized hyphae	Re	endoplasmic reticulum
HM	automelanization	S	septum
L	lipid globule	v	vacuole
M	mitochondria	W	woronin body

Fig. 1 — Sclérote en coupe transversale, observé au microscope électronique à balayage : on distingue le cortex (CO) et la médulla (ME).

Fig. 2 — Agrandissement de la zone intermédiaire entre le cortex et la médulla. Le cortex est formé d'hyphes associées en cordons.

Fig. 3 — Détail des cordons (COR), espaces libres entre les cordons.

Fig. 4 — Détails de la médulla : hyphes baignées dans un ciment inter-hyphal (Cih). Plusieurs hyphes paraissent colmatées.

Fig. 5 — Détail de la surface d'un sclérote formé dans le substratum : sclérote à cortex lisse et réduit : hyphes colmatées et s'entrecroisant (H).

Fig. 6 — Début de différenciation de sclérote (Primordium). Hyphes qui s'entrecroisent, et accumulation de mucopolysaccharides.

Fig. 7 — a. Biogenèse des sclérotes : primordium. Hyphes à parois épaisses et mélanisées, accumulation du ciment inter-hyphal, ramification des hyphes. b. Large hyphe à paroi épaisse (P) et automélanisation (HM).

Fig. 8 — Coupe à travers un primordium de sclérotes (après 4 jours de transfert) (même type de structures que dans la figure 7). Formation du cortex avec des hyphes fortement mélanisées (HM) dont les divers organites sont colmatés.
Paroi épaisse (P), forte accumulation du ciment inter-hyphal (Cih), vacuolisation intensive dans les hyphes du cortex (v). Les noyaux sont sphériques (N). Forte agglutination des hyphes de la médulla et développement des hyphes intra-hyphales.

Fig. 9 — Coupe longitudinale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale dont la structure est préservée, contenue dans une hyphe mélanisée (HM). Paroi épaisse des deux hyphes.

Fig. 10 — Coupe d'une hyphe du cortex. Plusieurs vacuoles à contenu très dense aux électrons (v). Cytoplasme riche en polysomes. Paroi épaisse avec une forte accumulation du ciment inter-hyphal (Cih).

Fig. 11 — Coupe transversale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale avec des globules lipidiques, des mitochondries (M) et des vacuoles (v). Structures entièrement mélanisées de l'hyphe principale (HM). Paroi épaisse des deux hyphes (P).

Fig. 12 — Détail de la structure d'une hyphe intra-hyphale. Nombreux globules lipidiques (L), vacuoles à contenu dense aux électrons (v), mitochondries (M), microcorpuscules (Mb) au voisinage des mitochondries et de nombreux polysomes.

Fig. 13 — Coupe transversale d'une hyphe de la médulla. Hyphe intra-hyphale, avec un noyau (N) et un microcorpuscule (Mb), comprimant les structures entièrement mélanisées de l'hyphe principale où subsistent encore des globules lipidiques.

Fig. 14 — Hyphe intra-hyphale avec des mitochondries montrant des figures myéliniques (flèche).

Fig. 15 — Coupe longitudinale d'une hyphe de la médulla. Nombreux noyaux dans cette hyphe (N). Noyau passant à travers un pore septal. Les flèches montrent les « pressions » que peut avoir subi le noyau et donc le sens de déplacement de ce dernier. Microcorpuscule fortement développé (Mb), saccules du réticulum endoplasmisque empilés (Re), faisceau de microfilaments en coupe transversale (F), granulations (g) observées le long du septum épais (S).

Fig. 16 — Détail de la figure 15. Pression exercée sur le noyau montrant dans quel sens le noyau se déplace (double flèche).

Fig. 17 — Empilement de saccules de réticulum endoplasmique lisse. Saccules du réticulum, fenestrés à leurs extrémités (flèche).

Fig. 18 — Huit saccules du réticulum endoplasmique (Re) empilés les uns sur les autres à la manière d'un appareil de Golgi.

Fig. 19 — Accumulations fibrillaires : coupe longitudinale au niveau d'un faisceau de microfilaments formant un véritable réseau (F).

Fig. 20 — Coupe transversale montrant l'organisation pseudo-cristalline des microfilaments (F).

Fig. 21 — Corps myélinique (« worls ») intra-mitochondrial (M).

Fig. 22 — Système vacuolaire (v) se formant à partir de l'enveloppe nucléaire (N).

Fig. 23 — Mitochondrie séquestrée par l'enveloppe nucléaire.

Fig. 24 — Vacuole autophagique développée par l'enveloppe nucléaire (double flèche). La lumière de la vacuole est légèrement transparente aux électrons (v).

Fig. 25 — Mitochondrie digérée par une vacuole autophagique (double flèche).

Fig. 26 — Vacuole autophagique à un stade avancé, avec des dépôts denses aux électrons et un corps myélinique.

Fig. 1 — Transversal section of sclerotia, observed with scanning electron microscope. Cortex (CO) and medulla (ME) are clearly seen.

Fig. 2 — High magnification of the jonction zone between cortex and medulla. Cortex is constitued by strands of hyphae.

Fig. 3 — Detail of strands (COR), empty spaces between strands.

Fig. 4 — Detail of medulla : hyphae are plunged in an inter-hyphal cement (Cih). Several hyphae appear to be cloged.

Fig. 5 — Sclerotia formed in the substratum. Detail of sclerotia surface, the cortex is smooth and reduced in thickness ; hyphae are cloged and cross one another (H).

Fig. 6 — First state of sclerotia differentiation (primordium). Hyphae that intersect and accumulation of mucopolysaccharides.

Fig. 7 — a. Sclerotia biogenesis : primordium. Hyphae with thick and melanized walls. Accumulation of inter-hyphal cement, ramification of hyphae. b. Large hyphae with thick walls (P). Automelanization of hyphae (HM).

Fig. 8 — Section throught a sclerotium primordia (4 days of shift-down : same structures as in figure 7). Cortex formation : highly melanized hyphae (HM) with cloged organelles. Thick wall (P) ; accumulation of inter-hyphal cement (Cih) ; intensive vacuolization of cortex hyphae (v). Nuclei are spherical (N). High agglutination of medulla and formation of intra-hyphal hyphae.

Fig. 9 — Longitudinal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae where all the structures are preserved and included in a melanized hyphae (HM) : thick walls of the two hyphae (P).

Fig. 10 — Section of cortex hyphae. Several vacuoles with electron dense material inside (v). The cytoplasm contains several polysomes. Thick wall and accumulation of inter-hyphal cement (Cih).

Fig. 11 — Transversal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae with lipid globules and mitochondria (M) and vacuoles (v). Principal hyphae (HM) where all structures are melanized. Thick walls of both hyphae.

Fig. 12 — Ultrastructure of intra-hyphal hyphae. Numerous lipid globules (L), vacuoles with electron dense content (v), mitochondria (M), microbodies (Mb) near mitochondria and numerous polysomes.

Fig. 13 — Transversal section of medulla hyphae. Intra-hyphal hyphae with nucleus (N) and microbody (Mb) compressing the melanized structure of the principal hyphae where subsist some lipid globules.

Fig. 14 — Intra-hyphal hyphae with mitochondria showing myelin figures inside (arrow).

Fig. 15 — Longitudinal section of medulla hyphae. Numerous nuclei (N) in this hyphae. Nucleus passing through the septal pore. Arrows show the pressions to which the nucleus is submitted and the removal direction of this later. Large microbody (Mb). Flattened cisterna of endoplasmic reticulum stacked (Re) ; transversal section of microfilament bundle (F), granulations (g) in a thick septum (S).

Fig. 16 — Detail of figure 15, showing the thick septum and the nucleus passing through the septal pore and the direction of removal (double arrow).

Fig. 17 — Cisterna of smooth endoplasmic reticulum. Cisterna fenestrated at the extremities (arrow).

Fig. 18 — Eight cisterna of endoplasmic reticulum (Re) stacked. Cisterna fenestrated as a Golgi apparatus.

Fig. 19 — Fibrillar accumulations : longitudinal section through bundle of filaments (F).

Fig. 20 — Transversal section of bundle showing pseudo-cristalline organization of microfilaments.

Fig. 21 — Myelin figures (« Whorls ») inside mitochondria (M).

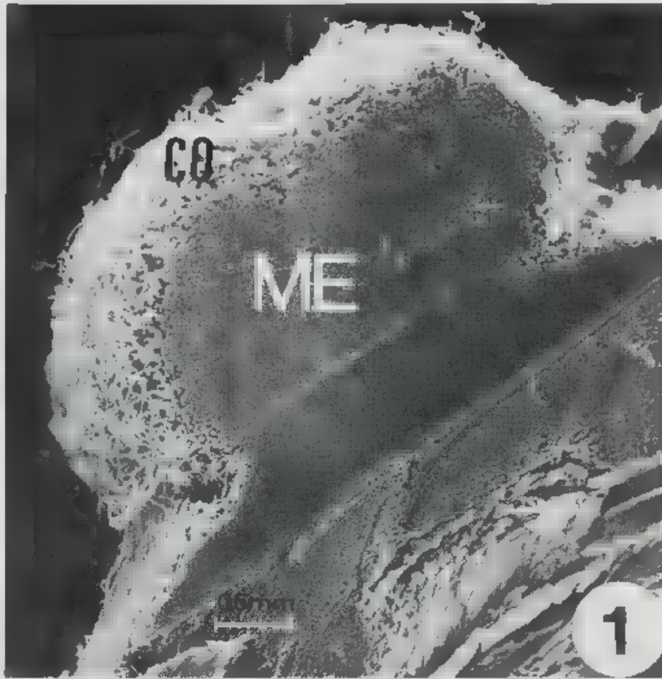
Fig. 22 — Formation of vacuolar system from the endomembranes : nuclear membrane (N).

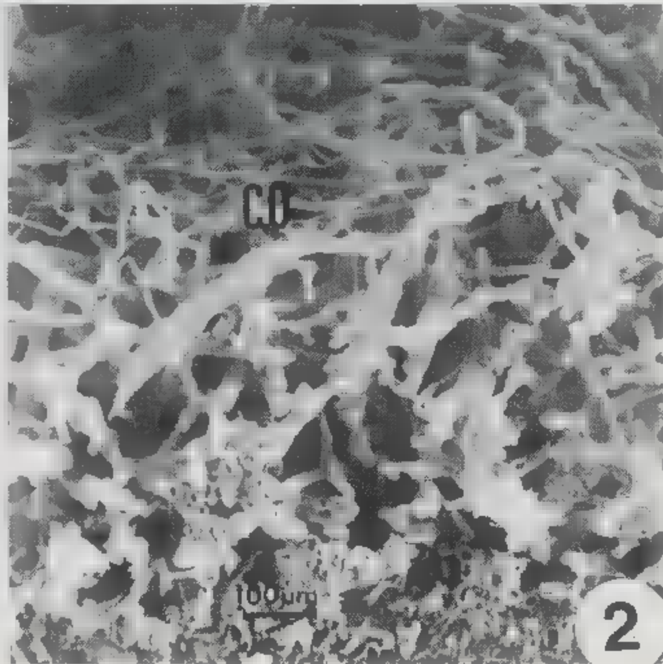
Fig. 23 — Mitochondria sequestrated by nuclear envelope.

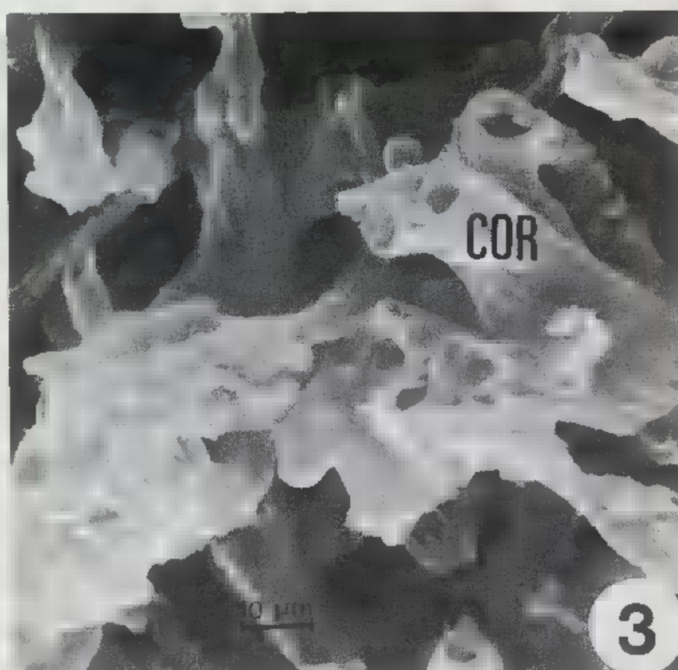
Fig. 24 — Autophagic vacuole (v) in contact with nuclear envelope (double arrow).

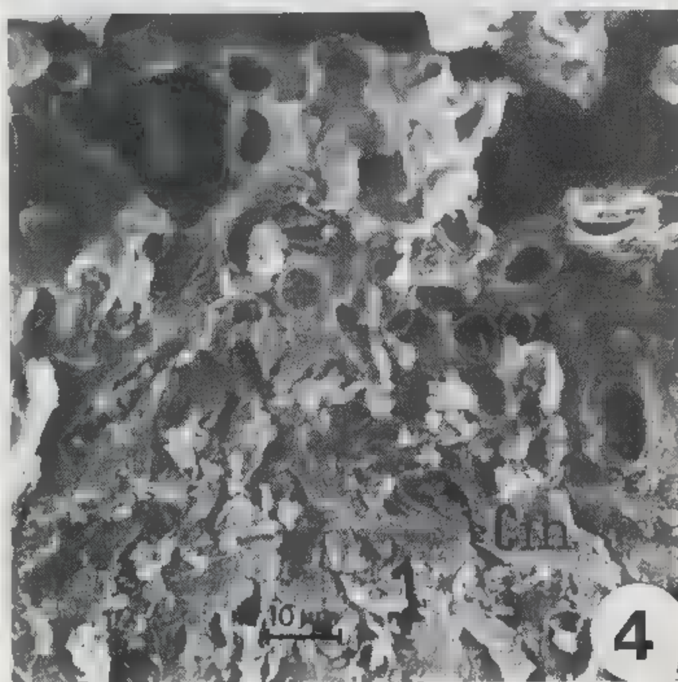
Fig. 25 — Mitochondria digested by an autophagic vacuole (double arrow).

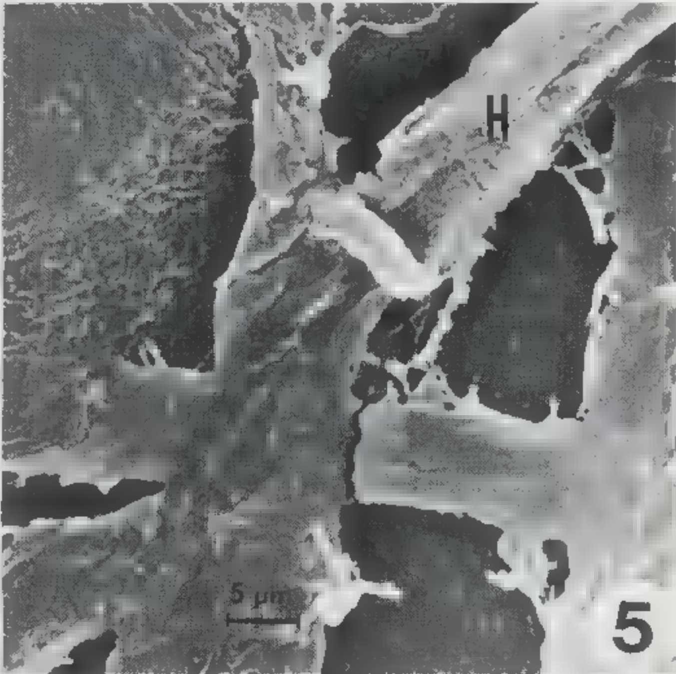
Fig. 26 — Advanced stage of autophagic vacuole with electron dense deposit and myelin figures.

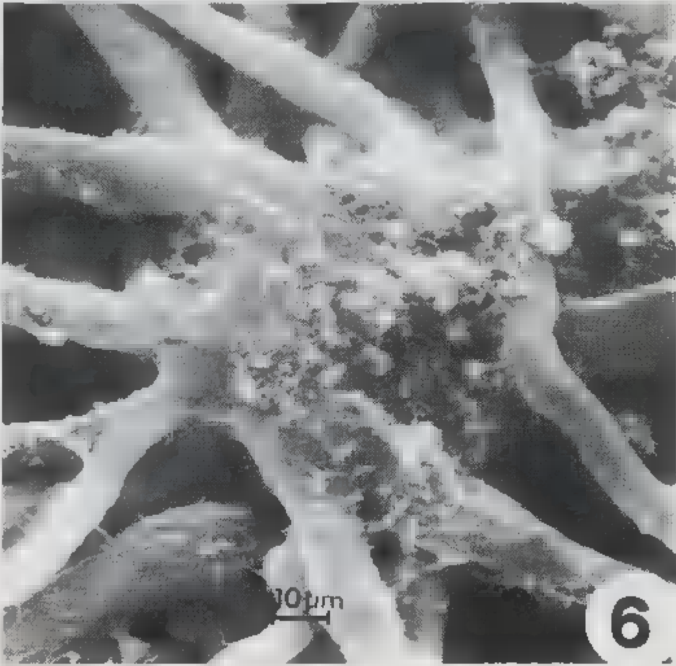

CO
ME
1

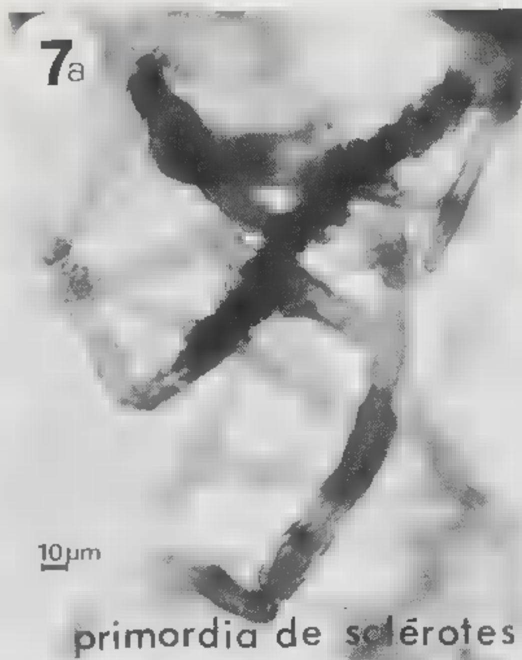

CO
100µm
2


COR
10 µm
3

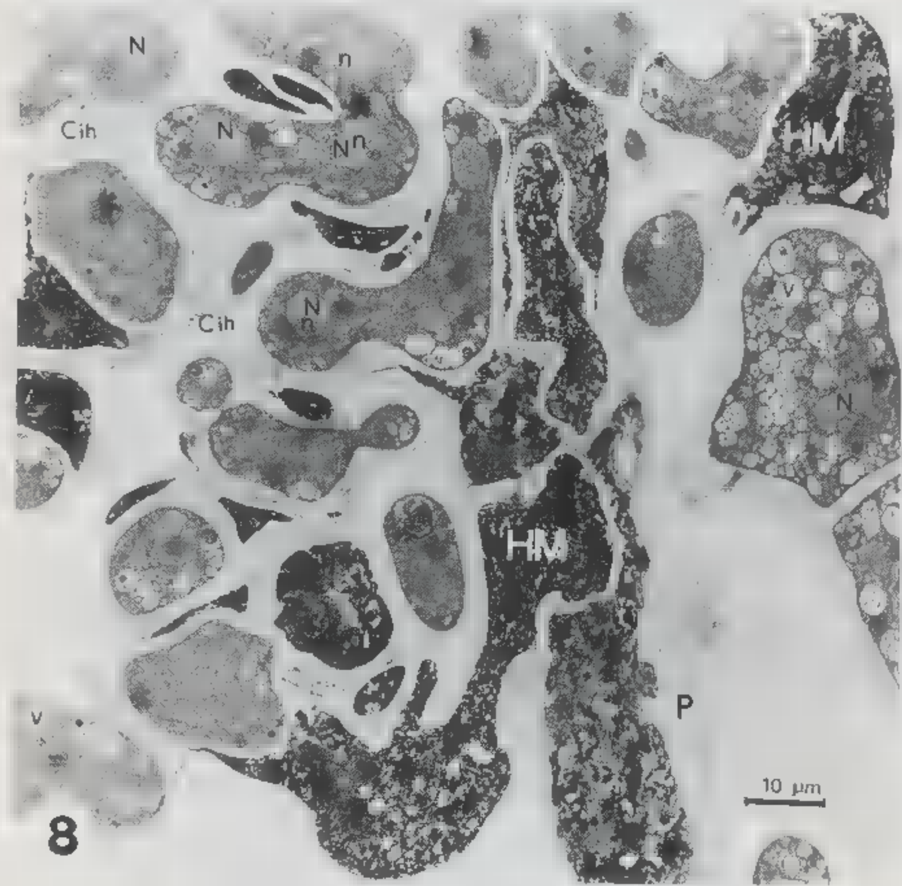

Cm
10 µm
4

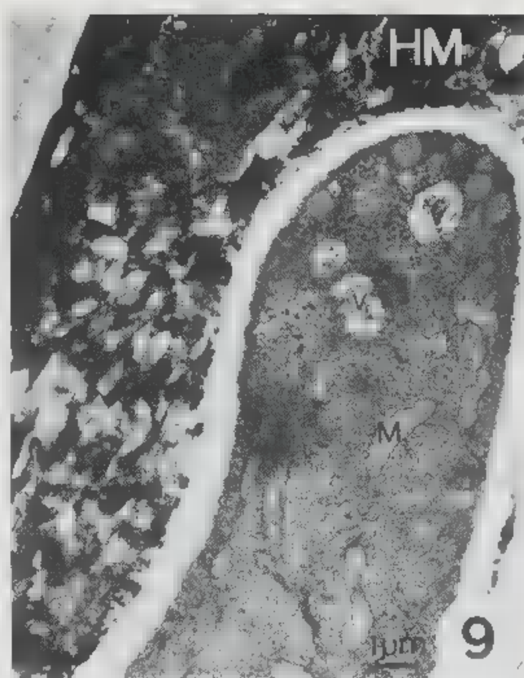

H
5 µm
5


10 µm
6

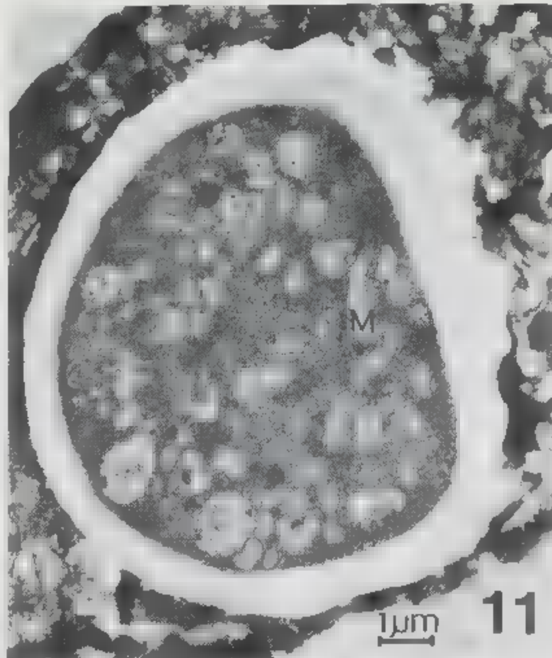

7a
10µm
primordia de sclérotes

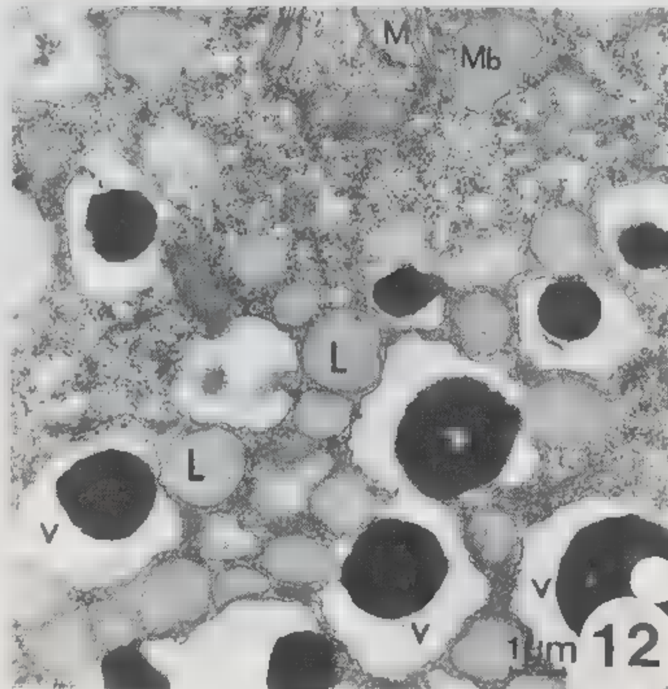

7b
HM
P
10µm

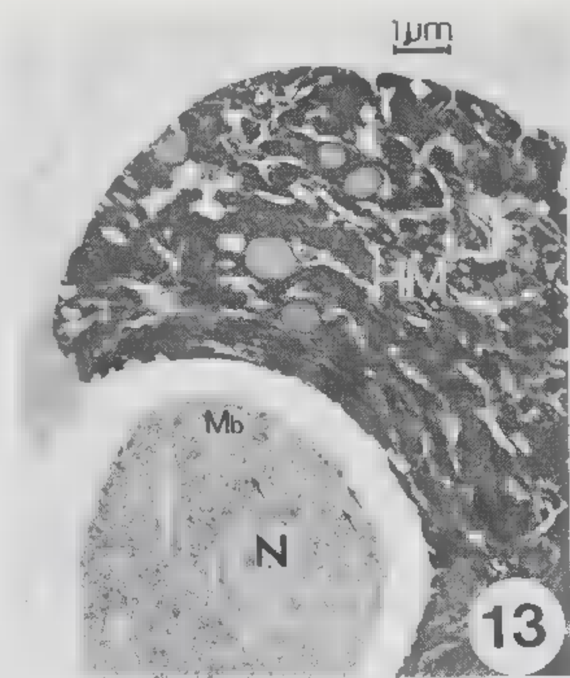

N
n
Cih
N
Nn
N
n
Cih
HM
v
N
HM
P
v
10 µm
8

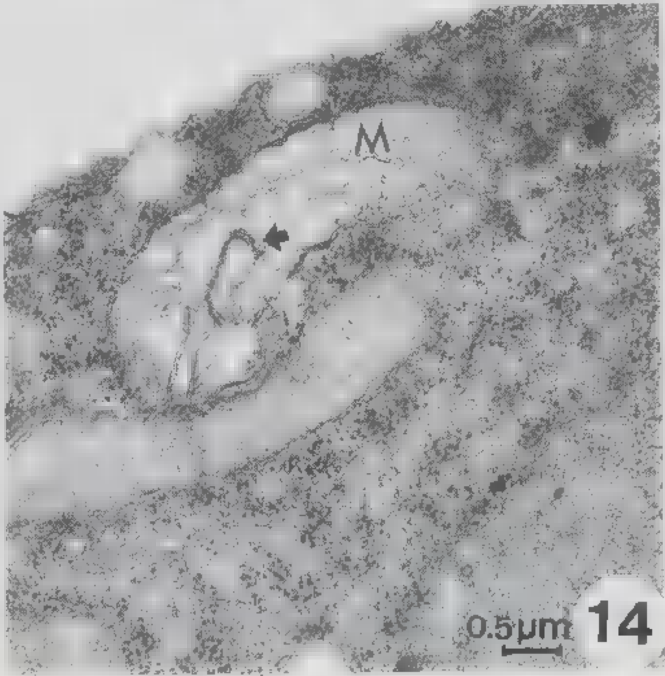

HM
V
M
1µm
9

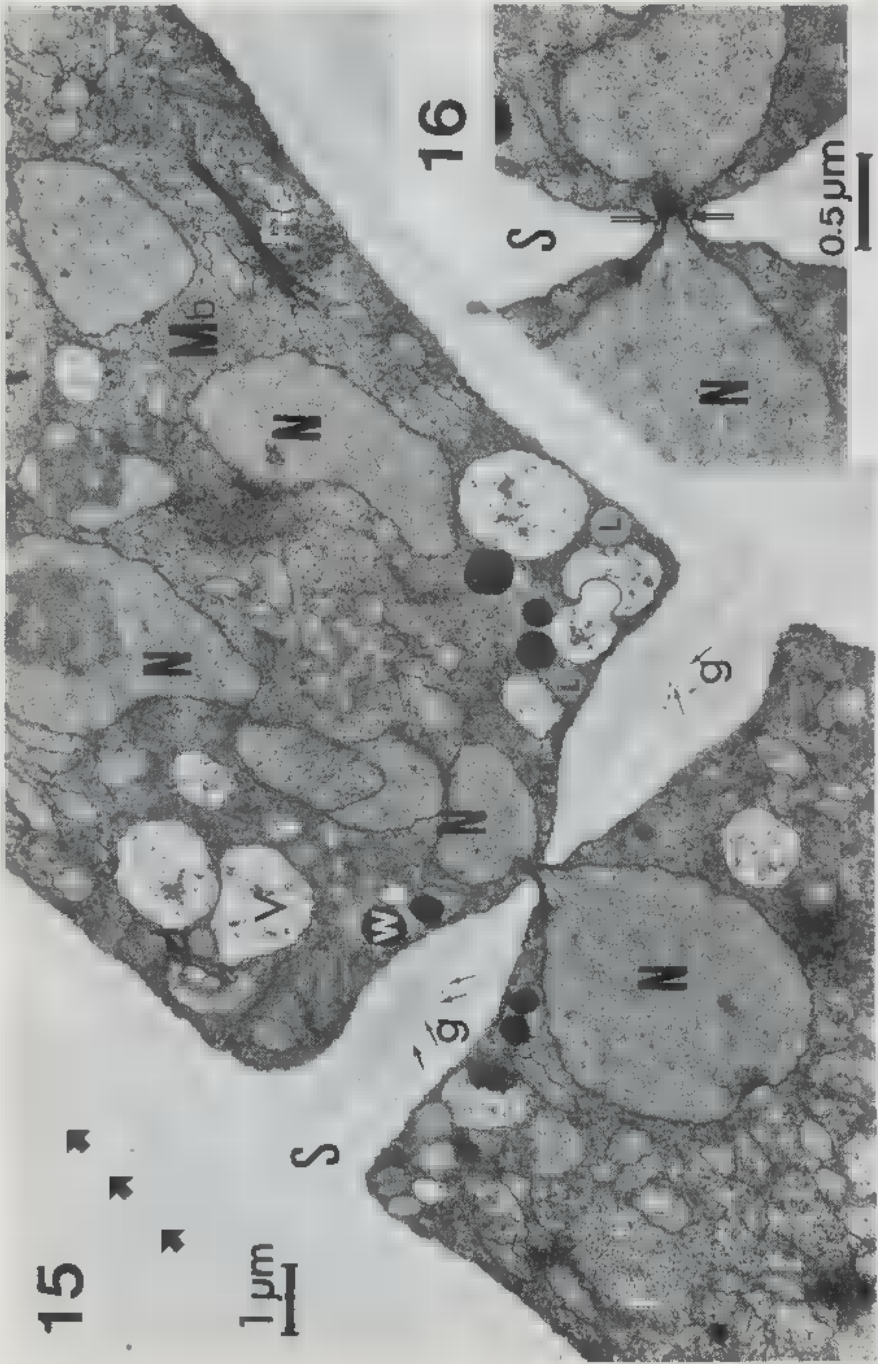

Cih
V
V
1µm
10

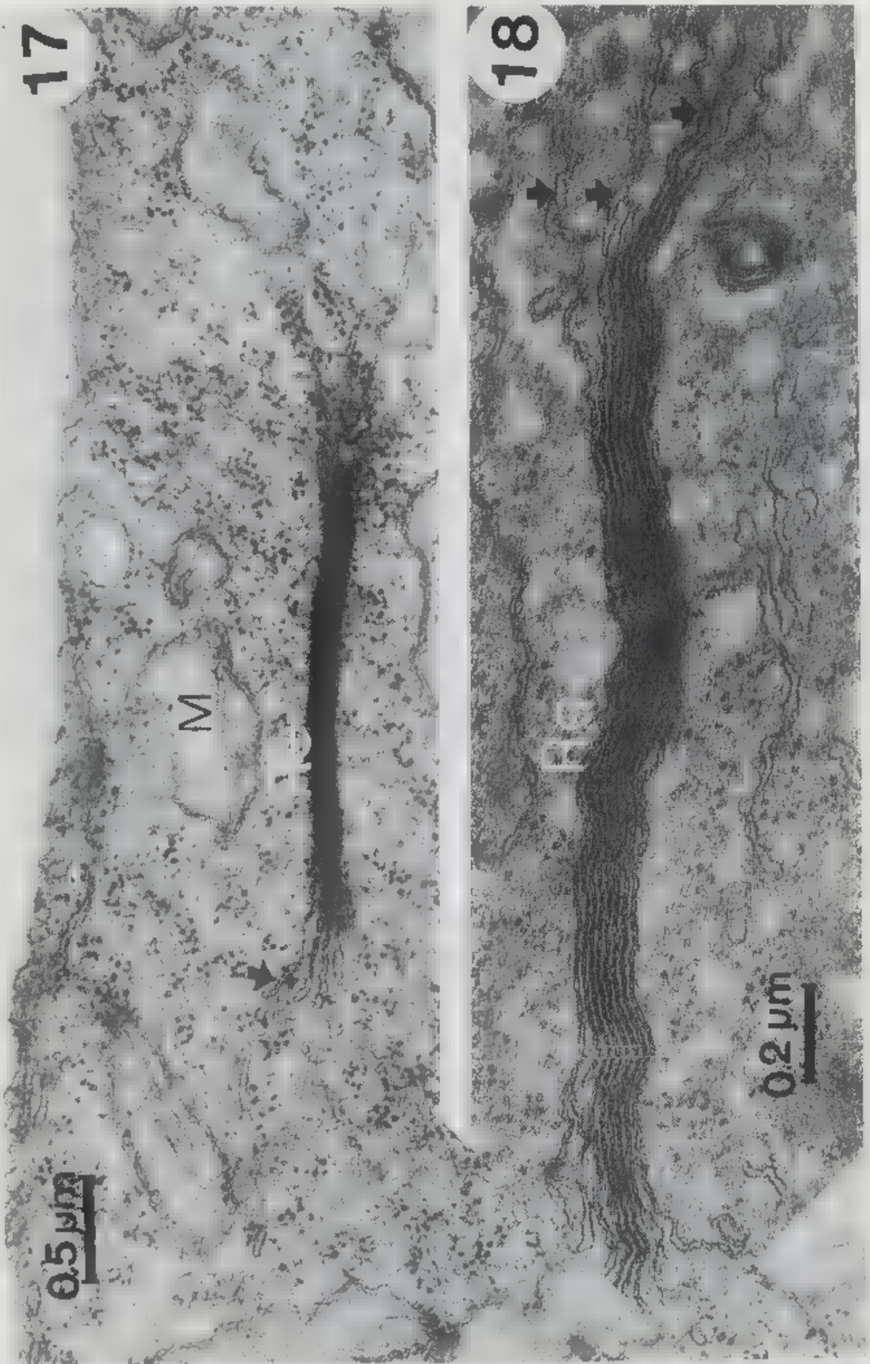

M
1µm
11

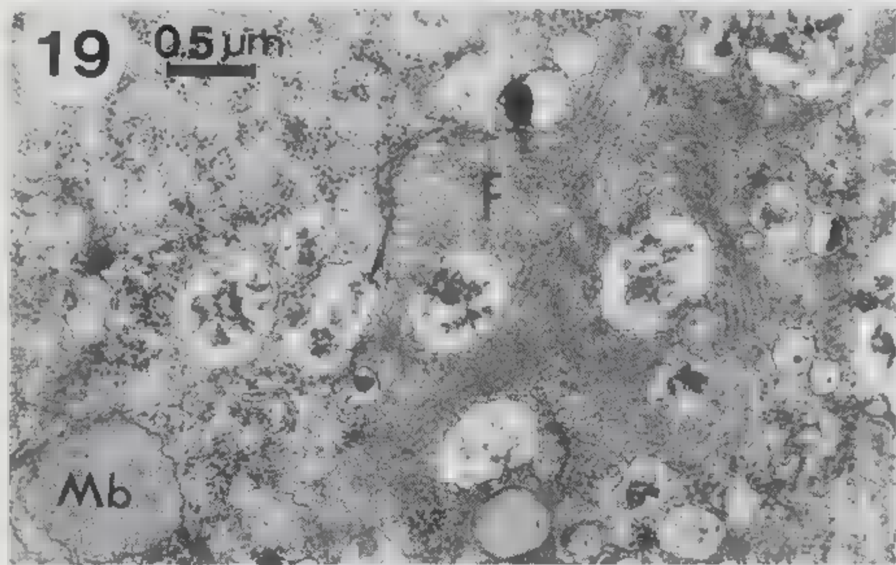

M
Mb
L
L
V
V
V
1µm
12

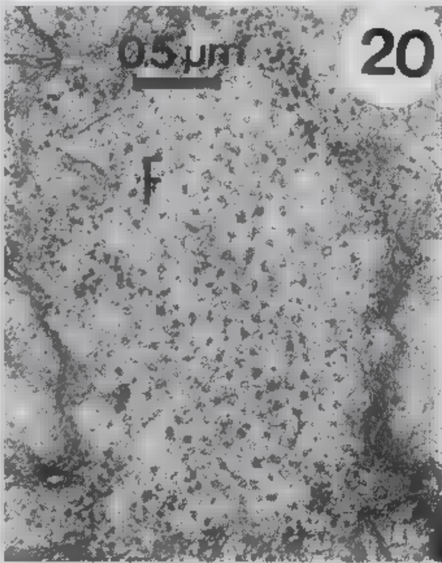

1µm
HM
Mb
N
13

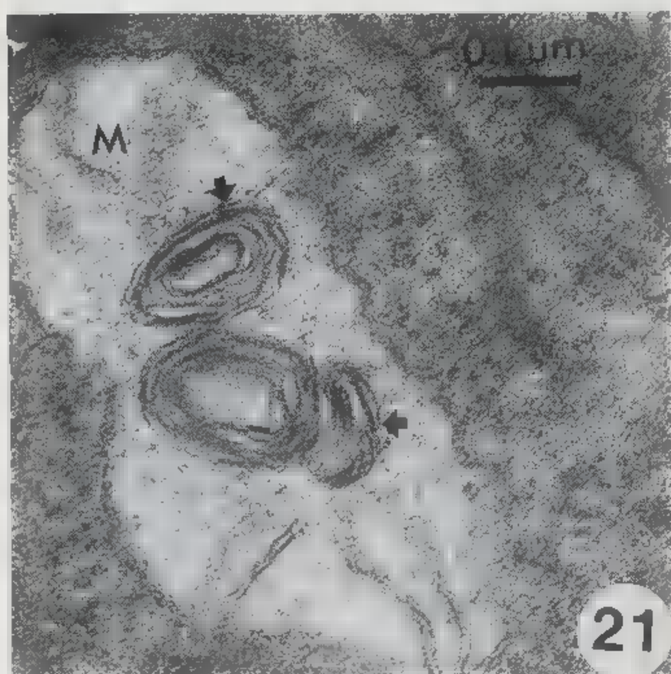

M
0.5µm
14

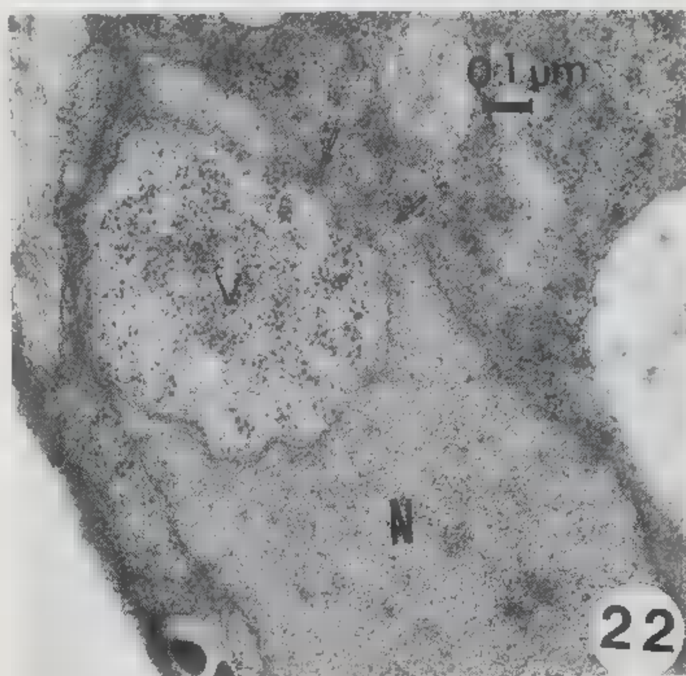

15
16
1 µm
0.5 µm
N
Mb
S
g
L
V
W

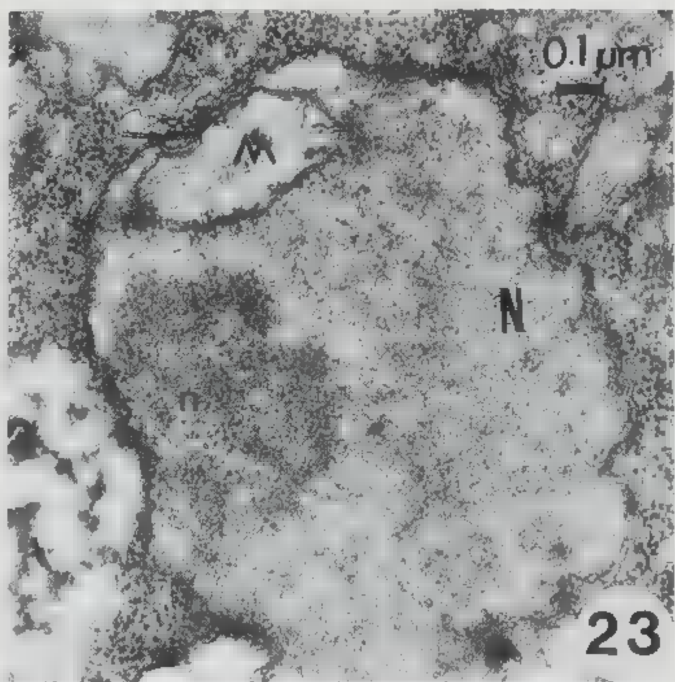

17
M
0,5 µm
18
0,2 µm

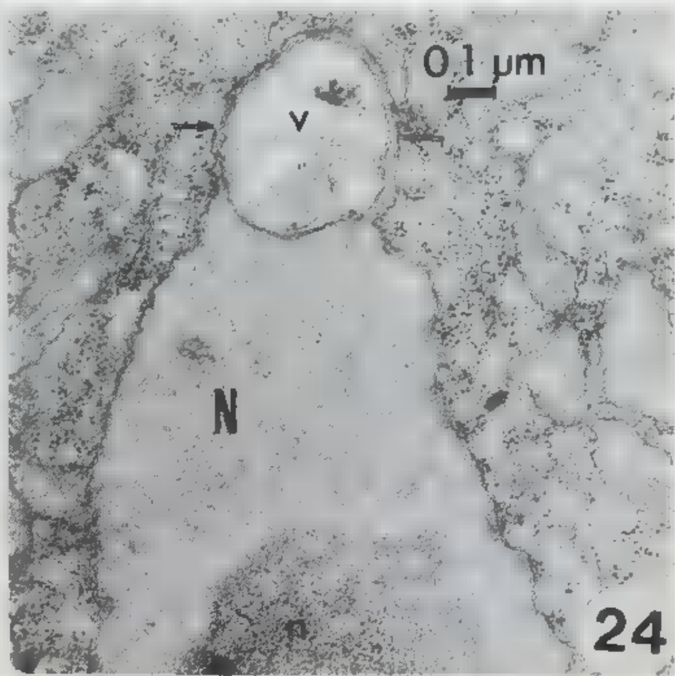

19
0,5 µm
F
Mb

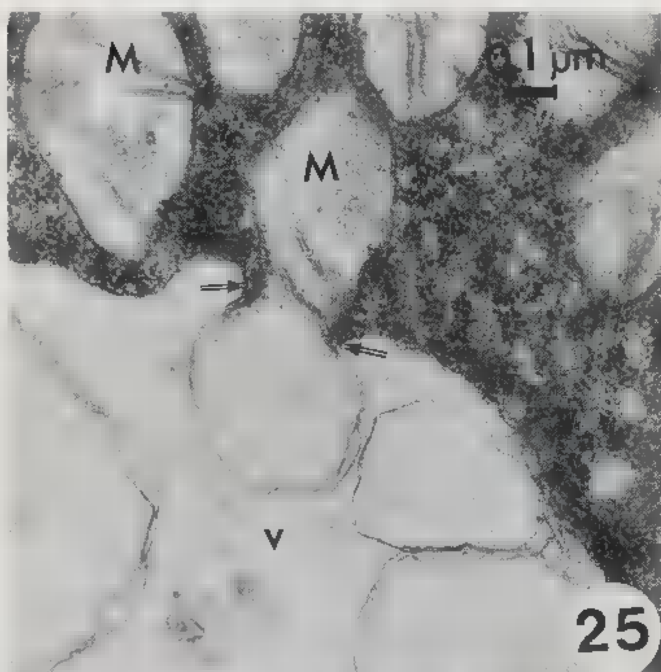

0,5 µm
20
F

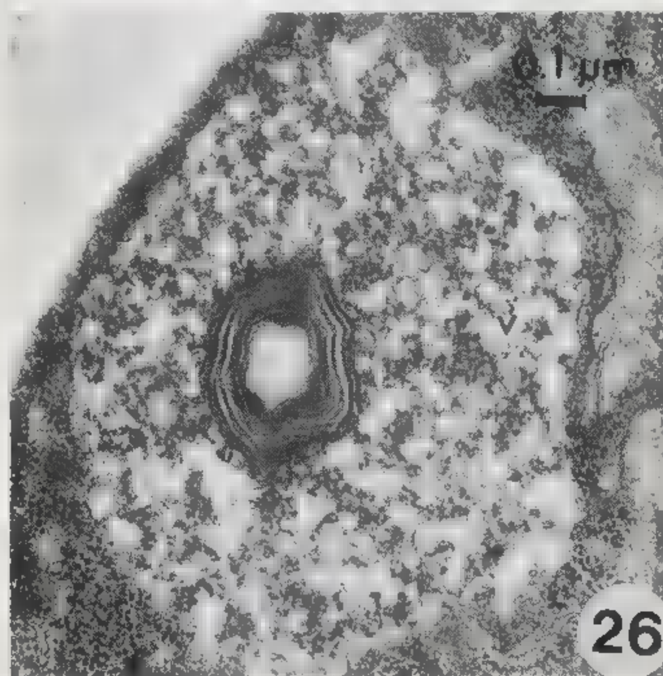

0,1 µm
M
21


0,1 µm
V
N
22


0.1 µm
M
N
n
23


0.1 µm
V
N
n
24


M
M
0.1 µm
V
25


0.1 µm
V
26

Source : MNHN, Paris

THERMOPHILIC AND THERMOTOLERANT FUNGI ASSOCIATED WITH SEEDS OF FIVE MEMBERS OF *UMBELLIFERAE* FROM EGYPT

by A.I.I. ABDEL-HAFEZ*, A.M.M. MOHARRAM** and A.Y. ABDEL-MALLEK**

SUMMARY — Eighteen thermophilic and thermotolerant species in addition to 2 varieties belonging to 13 genera were isolated from seeds of caraway (11 genera and 15 species), cummin (10 genera and 15 species), fennel (9 genera and 12 species), anise (8 genera and 11 species) and coriander (7 genera and 10 species) [redacted] glucose-Czapek's agar at 45°C. Total counts of thermophilic and thermotolerant fungi fluctuated according to the samples tested between 24-432, 30-496, 8-1000, 12-572 and 30-520 colonies per [redacted] dry seeds in the five types of seeds, respectively. *Aspergillus fumigatus, Emericella nidulans* and *Rhizomucor pusillus* were the most prevalent fungi in all types of seeds. Truly thermophilic fungi were isolated, but with variable densities and frequencies, from the various types of seeds and these were *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum, Humicola hyalothermophila, H. grisea* var. *thermoidea, Malbranchea pulchella* var. *sulfurea, Melanocarpus albomyces, Myceliophtora thermophila, Talaromyces dupontii* and *Thermomyces lanuginosus.*

RÉSUMÉ — Dix-huit espèces et 2 variétés thermophiles et thermotolérantes, appartenant à 13 genres, ont été isolées de graines de carvi (11 genres et 15 espèces), cumin (10 genres et 15 espèces), fenouil (9 genres et 12 espèces), anis (8 genres et 11 espèces) et coriandre (7 genres et 10 espèces) sur milieu Czapek (glucose), à 45° C. Les nombres de champignons thermophiles et thermotolérants fluctuent, respectivement dans les cinq types de graines, entre 24-432, 30-496, 8-1000, 12-572 et 30-520 colonies par gramme de graines sèches. *Aspergillus fumigatus, Emericella nidulans* et *Rhizomucor pusillus* sont les champignons les plus fréquents dans tous les types de graines. Des champignons thermophiles ont été isolés, mais avec des dentités et des fréquences variables, ce sont *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum, Humicola hyalothermophila, H. grisea* var. *thermoidea, Malbranchea pulchella* var. *sulfurea, Melanocarpus albomyces, Myceliophtora thermophila, Talaromyces dupontii* et *Thermomyces lanugisosus.*

KEY WORDS : Seed-borne, thermophilic fungi, thermotolerent fungi, caraway, cummin, fennel, anise, coriander.

* Botany Department, Faculty of Science at Sohag, Assiut University, Egypt.
** Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, Egypt.

INTRODUCTION

Thermophilic and thermotolerant fungi have been mostly associated with either heat-damaged or stored seeds from different places of the world (MULINGE & APINIS, 1969 ; MULINGE & CHESTERS, 1970 ; MILLS & BOLLEN, 1976 ; FLANNIGAN, 1969). These fungi were also isolated from stacks of oil palm kernels in Nigeria (OSO, 1974) and were found to cause serious deterioration during storage of the palm kernels (OSO, 1979) or palm produce (OGUNDERO, 1981a).

In Egypt, several investigations have been carried out on the frequencies of occurrence and densities of mesophilic seed-borne fungi (MOUBASHER & al., 1972, 1979, 1980, 1983 and others), but only that of MOUBASHER & al. (1979) and ABDEL-HAFEZ & SHOREIT (1986) dealt with thermophilic fungi associated with peanut, bean, lupine, and pea seeds. The present investigation aimed to study the densities and frequencies of occurrence of these fungi associated with seeds of five medicinal plants of the family *Umbelliferae* commonly used and cultivated in Egypt for their nutritive and medicinal values.

MATERIALS AND METHODS

Forty samples of each of caraway (*Carum carvi* L.), cummin (*Cuminum cyminum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Miller), anise (*Pimpinella anisum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds of crop 1986, of 250 g each, were collected from the market in eight Governorates from Egypt namely, Cairo, Giza, Beni-suef, El-Minya, Assiut, Sohag, Qena and Aswan. The number of samples from each governorate and seed type was five.

Determination of thermophilic (or thermotolerant) seed-borne fungi :

The dilution-plate method was used as employed by MOUBASHER & al. (1972). Czapek's agar medium was used in which glucose (10 g/l) replaced sucrose. Rose bengal (66 ppm) was added as a bacteriostatic agent (SMITH & DAWSON, 1944). Five plates were used for each sample and were incubated at 45°C for 7-10 days and the developing fungi were counted, identified and calculated per g dry seeds.

RESULTS AND DISCUSSION

Total counts of thermophilic and thermotolerant fungi were considerably high (Table 1) and anise seeds were the richest in total fungal population (8 700 colonies per g seeds in forty samples) followed by cummin (7 370 colonies), fennel (7 320 colonies), coriander (5 340 colonies) and caraway seeds (5 020 colonies). Total counts of these fungi ranged between 12-572, 30-496, 8-1000, 30-520, and 24-432 colonies per g dry seeds, respectively. ABDEL-HAFEZ & SHOREIT (1986) found that total counts of thermophilic and thermotolerant fungi were generally low in pea (193.2 colonies), bean (79.8 colonies) and lupine seeds (46.2 colonies per g in all samples ; 30 samples each) collected from eight Governorates in Upper Egypt.

Thirteen genera and eighteen species in addition to one variety of each of *E. nidulans* and *A. fumigatus* were identified on the whole. Broadest spectra of genera and species was recorded in caraway (11 genera and 15 species) followed by cummin (10 genera and 15 species), fennel (9 genera and 12 species), anise (8 genera and 11 species) and coriander seeds (7 genera and 10 species).

Genera and species	Anise		Caraway		Coriander		Cummin		Fennel	
	TC	NCI	TC	NCI	TC	NCI	TC	NCI	TC	NCI
Total count	8700		5020		5340		7370		7320	
Aspergillus fumigatus Fresenius	7522	39	3862	40	4770	39	5362	40	4970	40
Emericella nidulans (Eidam) Vuill.	228	22	290	30	58	12	764	32	880	23
Aspergillus terreus Thom	168	20	130	20	22	6	116	12	58	9
Emericella nidulans var. *latus* Thom & Raper	46	5	144	12	10	3	272	10	434	6
Emericella quadrilineata (Thom & Raper) Benjamin	34	3	50	6	2	1	84	3	214	4
Emericella rugulosa (Thom & Raper) Benjamin	12	1	30	4	-	-	2	1	163	3
Aspergillus fumigatus var. *albus* Rai, Twari & Agrawal	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus niger Van Tieghem	-	-	2	1	2	1	[illegible]	2	-	-
Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper	382	26	120	17	350	22	148	20	164	19
Mucor sp.	190	14	104	12	108	11	80	18	332	13
Malbranchea pulchella var. *sulfurea* (Miehe) Cooney & Emerson	26	6	24	7	4	1	20	5	12	5
Paecilomyces variotii Bainier	6	2	42	10	6	2	14	3	18	5
Humicola grisea var. *thermoidea* Cooney & Emerson	8	4	22	7	-	-	4	2	4	2
Humicola hyalothermophila Moubasher, Mazen & Abdel-Hafez	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-
Chaetomium thermophilum var. *coprophilum* Cooney & Emerson	4	1	28	3	-	-	14	2	-	-
Sepedonium chrysospermum (Bull.:Fr.) Link	-	-	4	2	2	1	2	1	4	1
Myceliophtora thermophila (Apinis) Oorschot	-	-	8	2	-	-	-	-	-	-
Melanocarpus albomyces (Cooney & Emerson) V.Arx	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-
Talaromyces dupontii Griffon & Maublanc	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-
Thermomyces lanuginosus Tsikinsky	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
Sterile mycelium	68	19	152	19	6	2	118	15	64	9

Table 1 — Numbers of cases of isolation, out of 40 samples (NCI), of fungal genera and species and their total counts (TC) calculated per g dry seeds of each of anise, caraway, coriander, cummin and fennel in every sample tested on glucose — Czapek's agar at 45°C. High occurence, between 20-40 cases ; moderate occurrence, from 10-19 cases ; low occurrence, from 5-9 cases ; rare occurence, less than 5 cases.

Tableau 1 — Genres et espèces de champignons isolés à partir de 5 types de graines (anis, carvi, coriandre, cumin, fenouil) sur milieu czapek (glucose) à 45°C.

Aspergillus fumigatus and *E. nidulans* were the most prevalent fungi. They emerged in 97.5% and 55%, 100% and 75%, 97.5% and 30%, 100% and 80%, and 100% and 57.5% of the samples contributing 86.5% and 2.6%, 76.9% and 5.8%, 89.3% and 1.1%, 72.8% and 10.4%, and 67.9% and 12% of total fungi, respectively. Reports from Malaysia showed that *A. fumigatus* was also the most frequent species on freshly harvested rice seeds (KUTHUBUTHEEN, 1979). *A. terreus* recovered in high frequency of occurrence (50% of the samples) from anise and caraway seeds, retreated to a backward situation in the other three seed types (15%, 30% and 22.2% of the samples). *E. nidulans* var. *latus* also isolated in moderate frequency of occurrence from caraway (30% of the samples) and cummin (25%) seeds, was of low or rare frequency in the other seed types (12.5%, 7.5% and 15% of the samples). The preceding species were also observed, but with variable densities and frequencies, from Egyptian peanuts, bean, lupine and pea seeds (ABDEL-HAFEZ & SHOREIT, 1986 ; MOUBASHER & al., 1979), as well as from Nigerian palm produce (OGUNDERO, 1981a). *E. quadrilineata*, *A. fumigatus* var. *albus*, *E. rugulosa* and *A. niger* were less common on all seeds.

Rhizomucor pusillus was also common on most types of seeds comprising 65%, 42.5%, 55%, 50%, and 47.5% of the samples, respectively. This species was previously encountered, but with variable densities and frequencies, from Egyptian soils, some types of seeds and self-heating materials (MOUBASHER & al., 1979, 1982), as well as from freshly harvested rice seeds from Malaysia (KUTHUBUTHEEN, 1979).

Paecilomyces variotii, moderately encountered from caraway seeds (25.0% of the samples), was less frequent on the remainder types of seeds (5-12.5%). MOUBASHER & al. (1979) isolated *P. variotii* in rare frequency of occurence (5% of the samples) from peanut seeds under the same experimental conditions.

Truly thermophiles such as *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *H. hyalothermophila*, *Thermomyces lanuginosus*, *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*, *Myceliophtora thermophila*, *Melanocarpus albomyces* and *Talaromyces dupontii* occured in reduced frequencies on one or several types of seeds tested (Table 1). MOUBASHER & al. (1982) found that the majority of these thermophiles were active colonizers of wheat and broad-bean straw composts. They also reported that wheat and broad-bean straws lost nearly half of their dry weight after 60 days of composting ; this loss was mainly attributed to the activity of thermophilic fungi. The remaining genera and species isolated (Table 1) were less frequent. Most of these fungi were reported from strored moist barley grains (MULINGE & APINIS, 1969), peanut (MOUBASHER & al., 1979), some leguminous seeds (ABDEL-HAFEZ & SHOREIT, 1986) and from different types of dates in Aswan area (NASSAR, 1986). *T. lanuginosus* was one of the most frequent species on freshly harvested rice seeds from Malaysia (KUTHUBUTHEEN, 1979), as well as from Nigerian palm produce (OGUNDERO, 1981a). FLANNIGAN & SELLARS (1972) found that *A. fumigatus, A. nidulans (= E. nidulans), A. terreus, M. pusillus (= Rh. pusillus)* and *T. lanuginosus* strains recovered from barley kernels were able to degrade arabinoxylan and carboxymethyl cellulose. They also reported (in 1977) that *A. fumigatus, M. pusillus (= Rh. pusillus)* and *T. lanuginosus* produced amylase, ß-glucosidase and ß-xylosidase. SELLARS & al. (1976) indicated that *A. fumigatus* could degrade barley husk and produce 1,4 ß-glucanase and ß-glucosidase when grown on eigher barley husk or crystalline cellulose. Thermophilic fungi were found to cause serious deterioration during storage of palm kernels (OSO, 1979), a considerable decrease in the oil contents of the palm fruit chaffs and the palm kernels by *C. thermophilum, T. lanuginosus* and *Torula ther-*

mophila (OGUNDERO, 1981b). Occurrence of these thermophilic or thermotolerant fungi in addition to mesophiles on the seeds of different plants which are grown in Egypt for their nutritive or medicinal values, calls for cautions handling during transport, storage and processing since numerous of these fungi were reported to be pathogenic to man and farm animals (COONEY & EMERSON, 1964 and LACEY, 1975).

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are deeply indebted to Prof. Dr. S.I.I. ABDEL-HAFEZ (Bot. Dept., Faculty of Science, Assiut University) for valuable help.

REFERENCES

ABDEL-HABEZ A.I.I. and SHOREIT A.A., 1986 — Mycoflora of bean, lupine and pea seeds in Egypt. *Aswan Sci. Techn. Bull.* 7 : 127-142.

COONEY D.G. and EMERSON R., 1964 — *Thermophilic fungi, Eumycota.* San Francisco, W.H. Freeman Publ. Co.

FLANNIGAN B., 1969 — Microflora of dried barley grain. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 53 : 371-379.

FLANNIGAN B. and SELLARS P.N., 1972 — Activities of thermophilous fungi from barley kernels against arabinoxylan and carboxymethyl cellulose. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58 : 333-341.

FLANNIGAN B. and SELLARS P.N., 1977 — Amylase, ß-glucosidase and ß-xylosidase activity of thermotolerant and thermophilic fungi isolated from barley. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 69 : 316-317.

KUTHUBUTHEEN A.J., 1979 — Thermophilous fungi associated with freshly harvested rice seeds. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 73 : 357-359.

LACEY J., 1975 — Potential hazards to animal and man from microorganisms in fodders and grains. *Int. Biodeterioration Bull.* 12 : 37-41.

MILLS J.T. and BOLLEN G.J., 1976 — Microflora of heat-damaged rapeseed. *Canad. J. Bot.* 54 : 2893-2902.

MOUBASHER A.H., EL-NAGHY M.A. and ABDEL-HAFEZ S.I.I. 1972—Studies on the fungus flora of three grains in Egyp. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 47 : 261-274.

MOUBASHER A.H., EL-HISSY F.T., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and HASSAN S.K.M., 1979 — The mycoflora of peanuts in Egypt. *Mycopathologia* 68 : 39-46.

MOUBASHER A.H., ABDEL-HAFEZ S.I.I., EL-HISSY F.T. and HASSAN S.K.M., 1980 — Effect of temperature and moisture content on Egyptian peanut seed-borne fungi. *Mycopathologia* 70 : 49-54.

MOUBASHER A.H., ABDEL-HAFEZ S.I.I, ABDAL-FATTAH H.M. and MOHARRAM A.M., 1982 — Fungi of wheat and broad-bean straw composts. II-Thermophilic fungi. *Mycopathologia* 78 : 169-176.

MOUBASHER A.H., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and ABDEL-KADER M.I.A., 1983 — Osmophilic fungi of barley grains in Egypt. *Bull. Fac. Sci. Assiut Univ.*

MULINGE S.K. and APINIS A.E., 1969 — Occurrence of thermophilous fungi in stored moist barley grain. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 53 : 361-370.

MULINGE S.K. and CHESTERS C.G.C., 1970 — Ecology of fungi associated with moist stored barley grain. *Ann. Appl. Biol.* 65 : 277-284.

NASSAR M.S.M., 1986 — Mycoflora associated with dates in Aswan area. M.Sc. Thesis. Bot. Dept., Faculty of Science at Aswan, Assiut University.

OGUNDERO V.W., 1981a — Thermophilic fungi from Nigerian palm produce. *Mycologia* 73 : 198-201.

OGUNDERO V.W., 1981b — Degradation of Nigerian palm products by thermophilic fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 77 : 267-271.

OSO B.A., 1974 — Thermophilic fungi from stacks of oil palm kernels in Nigeria. *Z. Allg. Mikrobiol.* 14 : 593-601.

OSO B.A., 1979 — Thermophilic fungi and deterioration of Nigerian oil palm kernels. *Econ. Bot.* 33 : 58-62.

SELLARS P.N., McGILL C.E.G. and FLANNIGAN B., 1976 — Degradation of barley by *Aspergillus fumigatus* Fres. *In* : J.M. SHARPLEY & A.M. KAPLAN, *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*. London, *Applied Science* : 635-643.

SMITH N.R. and DAWSON V.T., 1944 — The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate count of soil fungi. *Soil Sci.* 58 : 467-471.

GASTROCYBE IBERICA SP. NOV. IN SPAIN (BOLBITIACEAE, AGARICALES) [1]

by G. MORENO, C. ILLANA and M. HEYKOOP*

SUMMARY — A new species is proposed, *Gastrocybe iberica*, characterized by its non-anastomosing lamellae, hymeniform cuticle with abundant pileocystidia and its bisporic basidia. It has been collected abundantly in hygrophytic meadows with *Populus alba*, among *Poaceae* sp. and in meadows of *Hordeion leporini*.

RÉSUMÉ — Nous proposons comme nouvelle espèce *Gastrocybe iberica*, qui est caractérisée par ses lames non anastomosées, sa cuticule hyméniforme avec d'abondants piléocystides et ses basides bisporiques. Cette espèce a été récoltée en abondance dans des prairies hygrophytes sous *Populus alba*, entre des *Poaceae* sp. et dans des prairies d'*Hordeion leporini*.

RESUMEN — Se propone *Gastrocybe iberica* como una especie nueva para la ciencia caracterizada por sus láminas no anastomosadas, su cutícula himeniforme con abundantes pileocistidios y sus basidios bispóricos. Ha sido recogida muy abundante en praderas higrófilas de *Populus alba* entre *Poaceae* sp. y en praderas de *Hordeion leporini*.

KEY WORDS : Taxonomy, *Gastrocybe*, Bolbitiaceae, Basidiomycotina.

The genus *Gastrocybe* was created by WATLING (1968) for a gastromycetoid fungus, *G. lateritia* found in America, of which WATLING & al. (1966) later extended its chorology to Europe (Italy and Spain). The second species described up to date was found in North America, *Gastrocybe deceptiva* Baroni, and only the typus collection is known ; BARONI (1981) created this taxon based on the material collected by BARTHOLOMEW in 1896.

This genus is very close to *Galeropsis* Velen. & Dvorak in Velen. but they both mainly differ in the structure of the cuticle which is a hymeniform pileipellis in *Gastrocybe*, and a cutis with filamentous hyphae in *Galeropsis*.

1 This paper was presented at the « VII Simposio Nacional de Botánica Criptogámica », in Madrid (23-26 september 1987).

* Departement of Plant Biology (Botany), University of Alcalá de Henares, Madrid, Spain.



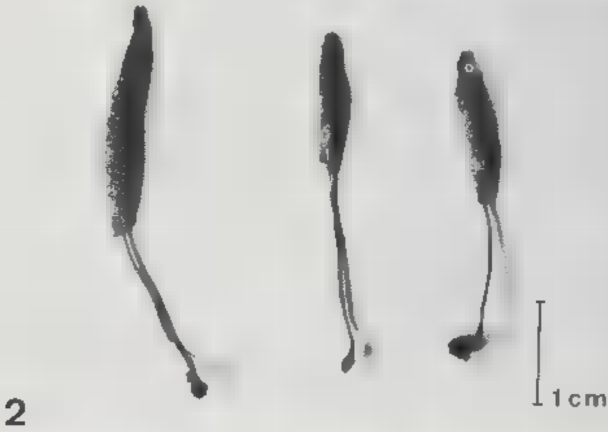




Fig. 1-3 — *Gastrocybe iberica* Moreno, Illana & Heykoop, carpophores (1-2, Holotypus n° 9 990 ; 3, n° 9 992).

At the present time the taxonomic position of this genus is controversial. For HAWKSWORTH & al. (1983) the genus *Gastrocybe* and *Galeropsis* belong to the family Galeropsidaceae, order Podaxales of the Gasteromycetes and they would be related to the family Bolbitiaceae of the Agaricales. SINGER & PONCE DE LEÓN (1982) placed it with the genus *Galeropsis* in the family Galeropsidaceae and pointed out that they represent secotiaceous fungi. Later on, SINGER (1986) still denotes that both genera belong to the family Galeropsidaceae and that they can be considered as Gasteromycetes in the traditional sense. WATLING & GREGORY (1981) distinguished agaricoid forms and gasteroid forms in the Bolbitiaceae and considered both genera, *Galeropsis* and *Gastrocybe*, among the gasteroid forms. WATLING & YOUNG (1983) included *Gastrocybe* in the Bolbitiaceae and not in the Galeropsidaceae. MOSER (1983) included the genus *Galeropsis* in the family Bolbitiaceae and no reference was made to *Gastrocybe*, possibly because it was unknown in Europe at that time. The first record of this genus in our contionent (Spain and Italy) is made by WATLING & al. (1986).

We agree with these last authors and believe that the genus *Gastrocybe*, together with *Galeropsis*, belong to the family Bolbitiaceae, an argument based on the fact that the new described taxon has dermatocystidia, which brings it near to some species of the genus *Conocybe*, furthemore, it presents closed carpophores which makes it close to *Galeropsis*.

Hypothetically, we think that it is possible that the genus *Galeropsis* had its origin through the genus *Gastrocybe*. The reason for this hypothesis is that some species of *Gastrocybe* are macroscopically exact to those of *Galeropsis*, and a microscopic study of their pellis is necessary to differentiate them. Besides, in the case of *Gastrocybe iberica* the hymeniform cuticle is reduced to one single layer of cells, sometimes difficult to observe under the microscope, and through the loss of this layer the genus *Galeropsis* could have been originated.

The microphotographs were made under a Nikon microscope model Optiphot with an incorporated system of automatic photography and "Normaski" interference contrast.

The material examined has been kept in the herbarium of the Departement of Plant Biology (Botany) of the University of Alcalá de Henares and the numeration is indicated for any consultation or revision.

Gastrocybe iberica Moreno, Illana & Heykoop, sp. nov., Fig. 1-16

Etymology : from latin *iberica*, relating to the place where this fungus was collected.

Pileus (0,6), 0,8 - 2,2 (2,5) cm longus, 0,2 - 0,4 cm latus, cylindricus, acuto apice, colori paleae simili, at cinereo in herbario, sine striis, glaber, cuius inferior pars clausam atque pedi adhaerentem se praebet.

Stipes, qui fit in basi paulo amplior (1) 2 - 4 (5,5) cm longus, fere 0,1 cm est latus. Laminae sunt ascendentes, pressae, proba forma, haud anastomosantes, interdum bifurcatae in basi, ochraceo-ferrugineo colore. Lamellulae non observantur. Velum abest.

Basidiosporae 15-20 (23) µm longae, 9-13 (18)µm sunt latae, quarum forma inter ellipsoidea et amygdaliformis, ochraceo colore, germinativo poro praeditae. Basidia bisporica sunt, 18-22 µm longa, 9-11 µm lata. Cystidia absunt. Pileipellis hymeniformis, cellulis quarum diameter est 9-17 µm longus constituta. Pileocystidia frequentissima, hyalina, lageniformia, quorum est longitudo maxima 60 µm , latitudo e 15 µm vergit in 6 µm rursusque in 8 µm. Fibulae adsunt.

Habitat : in pratis hygrophytis (Poaceae sps., Trifolio fragiferi-Cynodontetum), basico in solo (pseudogley) populeti (Populus alba). Item in pratis (Hordeion leporini), basico in solo (rendsinas). In praedio cui nomen « La Oruga », Compluti (Matriti) 30 TVK7282, leg. Moreno, C. Illana & M. Heykoop, 9-X-86, Holotypus n° 9 990.

Pileus (0.6) 0.8 - 2.2 (2.5) cm high and 0.2 -0.4 cm broad, cylindrincal, acute apex, cream-straw coloured, ash-coloured when dried, not striate and glabrous, touching the stipe being narrowed and applicate below. Stipe becoming slightly broader at the base (1) 2-4 (5.5) cm high and aproximately 0.1 cm broad. Lamellae ascendant, narrow, well formed, not anastomosing but sometimes forked at the base, ochraceous-ferrugineous. Lamellulae not observed. Veil absent.

Basidiospores 15-20 (23) × 9-13 (18) µm, variable in shape, ellipsoid-amygdaliform, ochraceous with germ pore not clearly visible under the optical microscope but very clear with « Nomarski » optics, and with hilar appendage. Basidia bisporic, 18-22 × 9-11 µm, sterigmata long, up to 7 µm in length. Cystidia not observed. Pileipellis hymeniform, formed by clavate to pyriform or subglobose cells, 9-17 µm in diameter. Pileocystidia very abundant, hyalines, lageniform at the base with a long cylindrical neck to subcapitate, up to 60 × 15 × 6 × 8 µm. Clamp connections present.

Habitat : In hygrophytic meadow (*Poaceae* sp., *Trifolio fragiferi-Cynodontetum*), basic soil (pseudogley) from poplar grove (*Populus alba*). And in meadows of *Hordeion leporini*, basic soil (rendsinas).

Material examined : Finca La Oruga, Alcalá de Henares (Madrid) 30TVK7282 leg. C. Moreno, C. Illana & M. Heykoop, 9-X-86, **Holotypus n° 9 990** ; ibidem leg. C. Illana, 11-X-86, n° 9 991 ; climbing from the Finca La Oruga to the hill Ecce-Homo, Alcalá de Henares (Madrid), 30TVK7281, leg. C. Illana, E. Illana & J. Chico, 2-XI-86, n° 9 993 ; Los Catalanes, Alcalá de Henares (Madrid) 30TVK7081, leg. C. Illana, I. López & P. Sánchez, 2-XI-86, n° 9 992 ; Tabla Pintora, Alcalá de Henares (Madrid) 30TVK6979, leg. C. Illana & M. Heykoop, 9-XI-86, n° 9 994. Isotypus in the herbarium of Dr. R. Watling in Edimburg (E) and in the herbarium of the Royal Botanical Garden of Madrid (MA-fungi).

Comments : *Gastrocybe iberica* is characterized by its non-deliquescent cylindrical pileus with acute apex and with the lower part closed and applicate to the stipe. The gills are not anastomosed. It shows very abundant dermatocystidia in the cuticle ; it has no pleurocystidia ; the basidia are bisporic and the spores have a clear germ pore well visible with « Nomarski » interference contrast. *Gastrocybe lateritia* Watling is different because of its quickly deliquescent carpophores with an open and cylindrical-campanulate to conical-campanulate pileus. Moreover, it presents lecythiform cheilocystidia and tetrasporic basidia. *Gastrocybe deceptiva* Baroni (= *Bolbitius tener* Berk. var. *incarnata* Peck), only known from North America (BARONI, 1981), is different from *G. iberica* because of the colour of its carpophores and the intervenose gills. Besides it lacks pileocystidia. The by BARONI (1981) observed and sketched cheilo- and pleurocystidia have not been observed in *G. iberica*. If we compare *G. deceptiva* with the new proposed species, they both have nearly identical macroscopic features, which is also a general character for all the species of the genus *Gastrocybe* ; they both have bisporic basidia and the same measurements of the spores too, though the germ pore is not so clear in *G. iberica* as in *G. deceptiva* seen under the optical microscope.

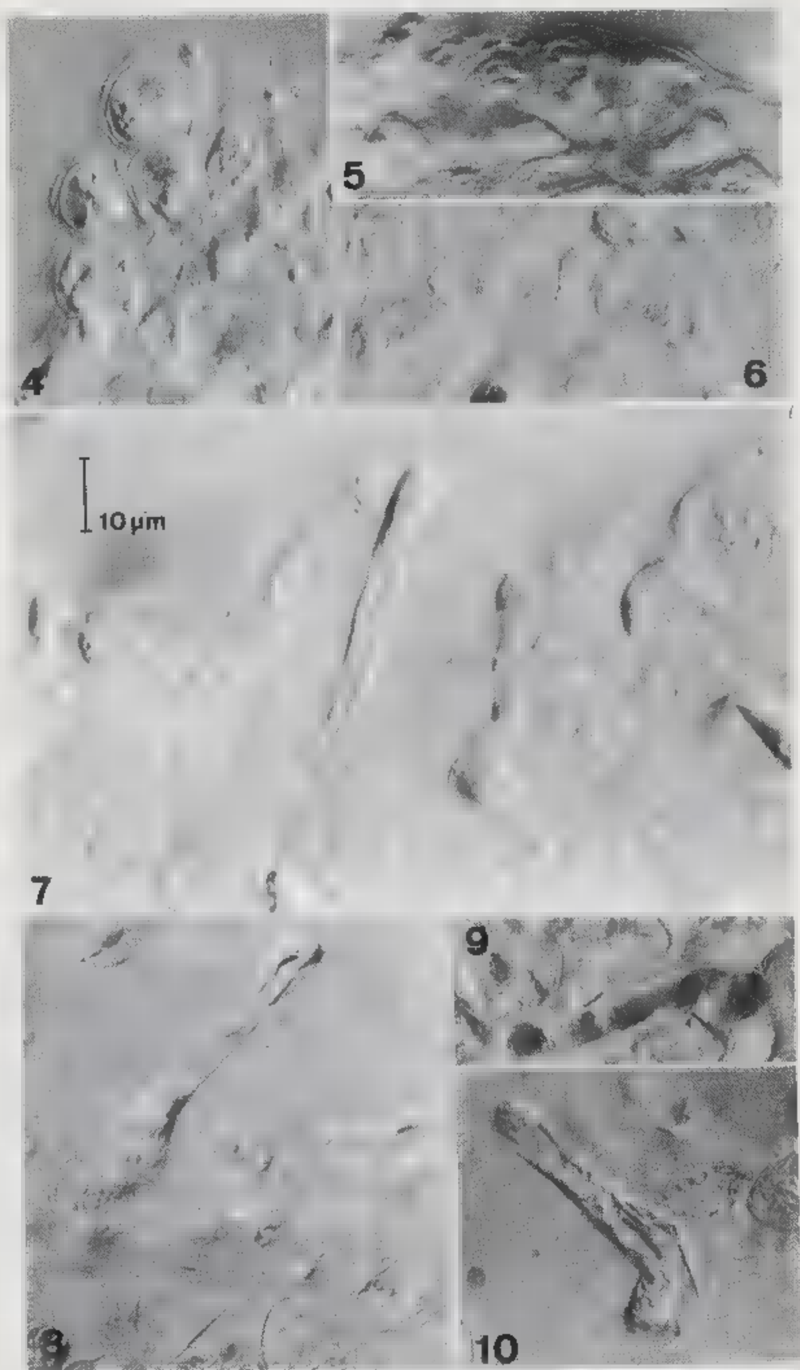


Fig. 4-10 — *Gastrocybe iberica* Moreno, Illana & Heykoop (Holotypus n° 9 990) ; 4-6 : hymeniform gelatinized cuticle, 7-10 : pileocystidia.

Fig. 4-10 — *Gastrocybe iberica* Moreno, Illana & Heykoop (Holotype n° 9 990) ; 4-6 : cuticule hyméniforme gélifiée. 7-10 : piléocystides.

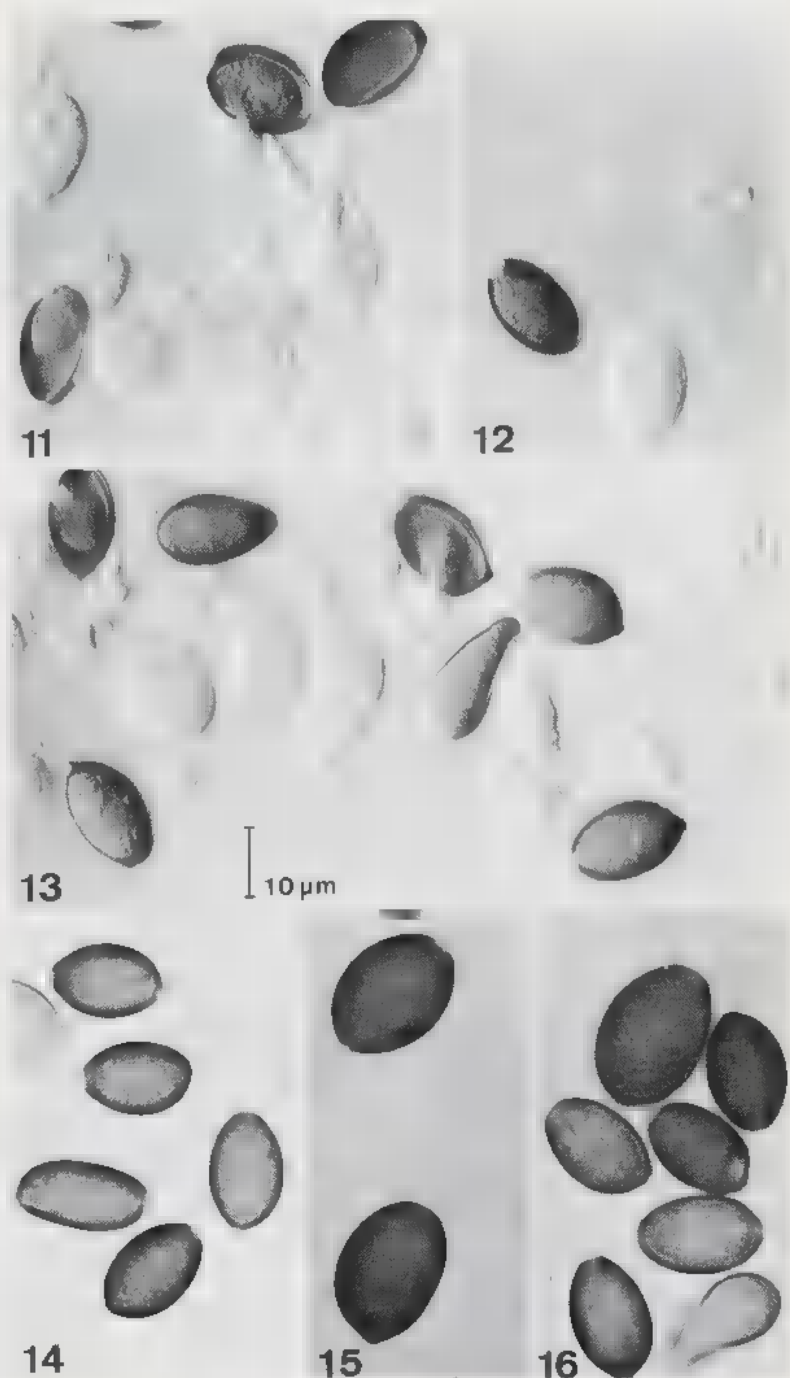


Fig. 11-16 — *Gastrocybe iberica* Moreno, Illana & Heykoop (Holotypus n° 9 990) ; 11-13 : bisporic basidia. 14-16 : basidiospores.

Fig. 11-16 — *Gastrocybe iberica* Moreno, Illana & Heykoop (Holotype n° 9 990) ; 11-13 : basides bisporiques. 14-16 : basidiospores.

The described species of the genus *Gastrocybe* Watl. can be differentiated in the following key.

1. Epicutis hymeniform .... *Gastrocybe* 2
1'. Epicutis a cutis .... *Galeropsis* ; SINGER (1963), HEIM (1950, 1968) and SINGER & PONCE DE LEÓN (1982)
2. Carpophore soon deliquescent ; with lecythiform cheilocystidia ; basidia tetrasporic .... *Gastrocybe lateritia*
2'. Carpophore not deliquescent ; without lecythiform cheilocystidia ; basidia bisporic 3
3. Lamellae intervenose ; without pileocystidia .... *Gastrocybe deceptiva*
3'. Lamellae free, not intervenose ; abundant lageniform pileocystidia, subglobose at the base .... *Gastrocybe iberica*

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly greateful to Dr. R. Watling for his scientific advises. Also to Dr. D.H. Pfister, curator of the Farlow Herbarium (FH) USA, for sending us the typus of *Gastrocybe deceptiva* Baroni. We also wish to thank Prof. S. Mariner-Bigorra for making the latin diagnosis. We also are greateful to Dr. F. Esteve-Raventós for advising us with the English manuscript.

REFERENCES

BARONI T.J., 1981 — Collections in the Farlow Herbarium : New species of *Melanophyllum* and *Gastrocybe*, type studies on *Armillaria* and *Stropharia*. *Mycologia* 75 : 181-197.

HAWKSWORTH D.L., SUTTON B.C. and AINSWORTH G.C., 1983 — *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute.

HEIM R., 1950 — Le genre *Galeropsis* Velenovsky (= *Cyttarophyllum* Heim), trait d'union entre Agaricales et Gastérales. *Rev. Mycol. (Paris)* 15 : 3-28.

HEIM R., 1968 — Deuxième mémoire sur les Cyttarophyllés. *Bull. Soc. Mycol. France* 84 : 103-116.

MOSER R., 1983 — *Die Röhrlinge und Blätterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. Band II b/2. Basidiomyceten. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.

SINGER R., 1963 — Notes on Secotiaceous fungi : *Galeropsis* and *Brauniella*. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., C*, 66 : 106-117.

SINGER R. and PONCE DE LEÓN P., 1982 — Galeropsidaceae west of the rocky mountains. *Mycotaxon* 14 : 82-90.

SINGER R., 1986 — *The Agaricales in modern taxonomy*. Koenigstein (RFA), Koeltz Scientific Books.

WATLING R., 1968 — Observations on the Bolbitiaceae IV. A new genus of gastromycetoid fungi. *Michigan Botanist* 7 : 19-24.

WATLING R. and GREGORY N.M., 1981 — Census catalogue of worlds members of the Bolbitiaceae. J. Cramer, *Biblioth. Mycol.* 82 : 1-224.

WATLING R. and YOUNG T., 1983 — A new species of *Panaeolopsis* Singer. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburg* 41 (2) : 395-399.

WATTLING R., QUADRACCIA L., TABARES M. and ROCABRUNA A., 1986 — *Gastrocybe* in Europe. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburg* 43 (2) : 307-311.

Source : MNHN, Paris

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

Von ARX J.A., GUARRO J. and FIGUERAS M.J., 1986 — The Ascomycetes genus *Chaetomium*. Beihefte zur Nova Hedwigia, Heft 84. Berlin, Stuttgart, J. Cramer, 612 p., 92 pl. ph.

A la révision de la famille des Chaetomiacées, publiée par von ARX J.A., DREYFUS M. & MULLER E. en 1984*, celle du genre *Chaetomium* constitue une suite logique.

Dans ce travail, les auteurs ajoutent aux espèces généralement acceptées 5 espèces nouvelles : *Ch. dreyfusii* v. Arx, *Ch. hispanicum* Guarro et v. Arx, *Ch. muelleri* v. Arx, *Ch. oblatum* Dreyfus et v. Arx et *Ch. repens* Guarro et Figueras.

En introduction ils présentent des considérations générales sur la morphologie, la physiologie et l'écologie des espèces du genre. La description des caractères culturaux, en conditions déterminées, est d'une grande importance dans la détermination des espèces. C'est pourquoi les auteurs ajoutent aux caractères morphologiques (paroi des ascomes, taille et forme et couleur des ascospores) des données d'ordre physiologique (vitesse de croissance, de production des ascomes et synthèse de pigments libérés dans le milieu) et donnent à l'ensemble une valeur taxonomique. Ils accordent une importance particulière à la symétrie des ascospores, la présence, le nombre et la position des pores germinatifs dans la délimitation des espèces. Par contre, la structure et la ramification des poils stériles, bien que pris en compte dans la clef de détermination, ne sont pas des caractères auxquels von ARX & al. donnent une valeur taxonomique, en raison de leur dépendance des conditions de l'environnement. De belles photographies en microscopie électronique à balayage, des photomicrographies et quelques planches au trait donnent d'intéressantes informations complémentaires.

Ce travail très clair et bien argumenté sera très utile pour les spécialistes du groupe, et pour les mycologues en général.

L. Bettucci

* Persoonia 12 : 169-179.

FASSATIOVA O., 1986 — Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. Progress in Industrial Microbiology, vol. 22. Amsterdam, Elsevier, 234 p.

Ouvrage de détermination des principales moisissures rencontrées ou utilisées en industrie, le livre décrit 31 espèces de Mucorales et 120 espèces de Moniliales.

Une clef de détermination des genres (selon les critères morphologiques classiques) précède chaque groupe et, dans chacun d'eux, les espèces les plus fréquentes sont décrites. Une clef de détermination spécifique est aussi proposée pour les *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*, genres les plus larges et fréquemment rencontrés dans l'industrie. Dans certains cas, la description des espèces est complétée par quelques notes concernant l'écologie. Des illustrations au trait ou photographiques, d'inégale qualité, complètent les descriptions. Chaque genre est suivi d'une liste de références bibliographiques (plutôt de nature systémati-

que) qui permettent d'approfondir ou de compléter les recherches d'identification. Cet ouvrage est assez complet et sera certainement utile aux chercheurs travaillant en mycologie appliquée même s'il n'apporte pas grand chose par rapport à ses prédecesseurs, généralement plus spécialisés.

M.F. Roquebert

AYRES P.G. and BODDY L., 1986 — Water, Fungi and Plants (British Mycological Society Symposium 11, Lancaster April 85). Cambridge, Cambridge University Press, 413 p.

L'eau joue un rôle critique dans le développement des champignons et des plantes, non seulement dans la constitution de la matière organique mais aussi dans le transport des éléments nutritifs à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et dans la conservation et la propagation des champignons.

Pourtant les publications sur ce thème étaient jusqu'ici ponctuelles et dispersées. L'ouvrage qui nous est proposé, compte rendu d'un symposium organisé par la British Mycological Society, constitue un bilan intéressant et original sur le sujet.

On peut y reconnaître trois parties principales, d'ailleurs complémentaires les unes des autres.

La première regroupe des articles d'ordre général, portant sur les phénomènes physiques, les méthodes de mesure, de contrôle du potentiel hydrique des organismes. Il précise les définitions et préconise l'homogénéisation des termes. C'est une bonne synthèse des données physiques et biologiques sur le rôle des gradients d'osmose et de turgescence dans la croissance végétative des champignons. L'incidence de l'humidité sur la formation, la dispersion et la germination des propagules est ensuite abordée. Un chapitre sur les relations entre la teneur en eau des sols et l'activité pathogène des micro-organismes qui y sont présents fait transition entre cette première partie et la deuxième qui traite plus spécialement de l'influence des variations d'humidité en phytopathologie (chap. 9 à 16).

La résistance aux maladies fongiques dépend en grande partie du degré d'humidité auquel la plante est soumise. L'effet du « stress hydrique » et son incidence sur la sensibilité aux pathogènes et sur la senescence est abordé en un chapitre auquel succèdent des analyses de questions ponctuelles telles que l'alternance sécheresse-irrigation en culture tropicale, l'effet inhibiteur sur les champignons de composés excrétés par la plante en réaction au stress hydrique (ABA), le rapprochement entre le rôle de ces composés et les phytoalexines sur le fonctionnemEnt des stomates, l'incidence de la présence des champignons dans les échanges hydriques des plantes.

La troisième partie (4 chapitres) a trait à la biodégradation des végétaux par les champignons et souligne, bien sûr, l'importance de la teneur en eau des substrats et des enceintes de stockage dans cette décomposition. Un dernier chapitre qui porte sur le rôle de l'eau dans le processus de décomposition des écosystèmes terrestres complète cet ensemble d'exposés.

Cet ouvrage est un bilan fort intéressant sur les connaissances du rôle de l'eau dans la biologie des champignons et des plantes ou dans les interactions entre ces organismes et l'environnement. Il devrait intéresser les chercheurs fondamentalistes et les phytopathologistes comme ceux de l'industrie agroalimentaire et ouvrir de nouvelles voies d'investigation dans ce domaine.

M.F. Roquebert

ALLSOPP D. & SEAL K.J., 1986 — Introduction to biodeterioration. London, Edward Arnold, 136 p.

L'objet de ce petit livre est de présenter, de manière synthétique, les différents aspects de la biodétérioration, définie comme étant l'attaque par des organismes vivants des matériaux mis en œuvre par l'homme. Les auteurs commencent par cadrer, un peu rapidement, les dimensions scientifiques et économiques du problème, qui couvre un large domaine d'applications très diverses. Ils examinent ensuite successivement, et selon un ordre logique, les diverses classes de produits susceptibles d'être attaqués. Ils évoquent en premier lieu les matériaux naturels : cellulose, bois, denrées alimentaires, cuirs, textiles, pierres ; puis ils examinent la biodétérioration des matériaux manufacturés et transformés : carburants et lubrifiants, matières plastiques, peintures, produits pharmaceutiques, métaux et adhésifs. Ils s'intéressent ensuite aux problèmes posés dans le bâtiment, les eaux, les moyens de transport, ainsi qu'au cas très particulier des collections de musées.

Pour chaque cas, les organismes responsables des dégâts ou nuisances sont signalés, qu'il s'agisse de bactéries, de champignons, de végétaux supérieurs, d'insectes ou de rongeurs. Les moyens de détection, de protection et de lutte sont également évoqués à chaque étape, en faisant bien ressortir l'incicence des critères économiques dans le choix des décisions.

Suit une intéressante description des méthodes pratiques d'enquête, de diagnostic et de sélection des traitements, ainsi que des techniques d'analyses et d'essais de simulation en laboratoire ou dans l'environnement. Enfin, les diverses méthodes de lutte physique, chimique et biologique sont résumées.

Bien entendu, vu l'ampleur et la diversité du sujet, cet ouvrage ne se prétend pas exhaustif, et il est nettement insuffisant, à lui seul, sur le plan pratique pour traiter d'un problème de biodétérioration, qu'il s'agisse de l'identification des organismes déprédateurs ou des traitements à appliquer. Comme son titre l'indique, il s'agit en réalité d'une introduction, fort bien faite, sur le sujet, à considérer plutôt comme un condensé destiné à sensibiliser un lecteur intéressé ou concerné, que comme un manuel technique. Fort heureusement, l'ouvrage est complété par une bibliographie générale et spécialisée assez brève, mais judicieuse et bien actualisée, qui permettra d'approfondir un sujet particulier en cas de nécessité.

J. Oudot

GINNS J.H., 1986 — Compendium of Plant Disease and Decay Fungi in Canada 1960-1980. Ottawa, Canadian Government Publishing Centre (Research Branch, Agriculture Canada, Publication 1813), i-x, 416 p.

La parution de ce Compendium à l'occasion du centenaire de la division Recherches (ministère de l'Agriculture), représente une étape importante dans l'histoire mycologique de ce pays, en particulier pour la phytopathologie. En effet, il vient savamment compléter et rectifier l'*Annotated Index of Plant Diseases in Canada* de I. L. CONNORS, publié il y a vingt ans. J. H. GINNS, du Biosystematics Research Institute d'Ottawa, est un mycologue réputé, entre autres par ses nombreux travaux sur la systématique des Basidiomycètes déprédateurs de bois.

Ce manuel technique de 400 pages est « conçu pour aider les phytopathologues, les reproducteurs de plantes, les écologistes, les services phytosanitaires et les taxonomistes dans l'identification des champignons se développant, au Canada, sur des plantes aussi bien cultivées que sauvages », mais son cadre d'utilité déborde largement cet objectif. Il présente une masse d'informations provenant de

2 000 articles sélectionnés parmi ceux publiés entre 1960 et 1980 dans des monographies et des revues scientifiques importantes de l'hémisphère nord-américain. En fait, c'est un résumé des observations faites sur des champignons observés sur du matériel végétal, vivant ou mort, au cours de cette période.

L'ouvrage se compose de quatre sections majeures. Après une introduction précisant les divers objectifs visés, on trouve un index des hôtes, une bibliographie et les index des champignons. L'index des hôtes constitue le corps de l'ouvrage (264 p.). Il concerne près de 600 genres rangés par ordre alphabétique, système de classement choisi pour la présentation des informations de toute nature. Chaque genre comporte les espèces végétales relevées dans les documents consultés, avec quelques annotations intéressantes sur l'origine géographique, le nom commun français et anglais et l'aire de répartition dans les provinces et territoires canadiens. Cette liste d'espèces est suivie par celle des champignons détectés sur ces plantes-hôtes, et l'on y trouve pour chacun également des informations concernant la distribution au Canada et le(s) numéro(s) de la référence bibliographique. Au total, près de 4 000 champignons reconnus constituent ces listes partielles. Ils relèvent de tous les groupements systématiques classiques et représentent aussi bien des pathogènes notoires, répandus ou rares, que des espèces dont l'importance économique, réelle ou anodine, n'a pas encore été confirmée, ou bien des éléments se développant en association avec les symptômes des maladies ou encore sur des tissus végétaux morts.

Le chapitre bibliographie présente les 2 000 titres reproduits sur seulement 34 pages. Il est suivi par un index des espèces fongiques à double entrée, genre et espèce, avec dans les deux cas un renvoi à la bibliographie. En raison de la diversité des rôles écologiques sur lesquels se fonde la sélection des éléments fongiques, le premier index comporte des genres à composants réputés phytopathogènes tels que *Ascochyta*, *Ceratocystis*, *Cercospora*, etc., qui présentent respectivement un nombre marqué d'espèces, et des entités génériques de champignons déprédateurs de bois : *Corticium*, *Peniophora*, *Polyporus*, *Poria*, etc. (ceux-ci révèlent aussi un nombre élevé d'espèces) et, enfin, des genres réunissant de simples saprophytes. Pour le nombre d'espèces par genre, *Puccinia* semble se placer en tête avec un chiffre voisin de cent cinquante.

Il y a lieu de souligner que la sélection, la transcription, la synthèse, et la reproduction du contenu informatif de cet ouvrage (près de 30 000 entrées) n'ont pu être accomplies que grâce aux efforts conjugués et méritants de nombreux collaborateurs techniques et scientifiques. S'il est évident que les informations publiées ont été sérieusement évaluées pour leur niveau de crédibilité et la position taxonomique des champignons cités, on note également un effort sensible de mise à jour de leur binôme et une adaptation des noms d'auteurs aux règles actuelles de la nomenclature. Un format adéquat, une présentation par page sur double colonne, des pages bien aérées permettant un balayage visuel rapide et une lecture aisée, constituent des solutions originales pour une présentation soignée de cette importante masse d'observations.

Ce Compendium est « une étape vers la constitution d'une flore mycologique du Canada ». Il servira pour l'étude des interactions possibles entre les champignons pathogènes, la mycoflore permanente et leur substrat écologique. A notre avis, c'est un modèle en son genre dans ce domaine, à suivre pour la réalisation de compendiums d'autres pays. Il sera sans doute activement consulté par des mycologues situés en dehors du territoire canadien.

J. Mouchacca

BOIDIN J. et LANQUETIN P., 1987 — Le genre *Scytinostroma* Donk. Berlin, Stuttgart, J. Cramer, Gebrüder Borntraeger, *Bibliotheca Mycologica*, Band 114, 130 p.

Bien qu'ils s'en défendent, les auteurs présentent ici une véritable monographie du genre *Scytinostroma* puisque la totalité des espèces décrites à ce jour est étudiée. Les mycologues qui se sont essayés à l'étude des espèces de ce genre connaissent les indiscutables difficultés auxquelles ils ont à faire face : c'est d'abord la consistance de la chair du basidiome, très coriace du fait de l'abondance de fibres intriquées masquant les hyphes génératrices ; c'est ensuite l'hyménium à la fois diffus et fragile ; ce sont enfin les spores très souvent absentes. Conscients que l'examen des nombreux spécimens d'herbier qu'ils ont effectué — pour indispensable qu'il soit — ne leur permettait pas de comprendre le genre de façon satisfaisante, les auteurs ont axé leur travail sur l'étude de récoltes fraîches, accompagnées de sporées. Cette démarche constitue la caractéristique majeure de l'ouvrage.

Le livre débute par un exposé détaillé des méthodes d'étude les plus favorables à une observation précise. Sont ensuite traités la question de la délimitation — particulièrement ardue — entre les genres *Vararia* et *Scytinostroma* puis l'évolution et les affinités du genre *Scytinostroma*. Suit une clé des espèces, précédant elle-même l'essentiel du travail qui est consacré à la description de celles-ci ; cette description est accompagnée des données culturales et cytologiques chaque fois que cela était possible. En ce qui concerne les caractères des mycéliums, les auteurs présentent leurs résultats inédits ou renvoient à leurs travaux antérieurs. Les espèces sont classées par ordre alphabétique et, pour la très grande majorité d'entre elles, accompagnées d'une planche de dessins qui illustre les gloeocystides et les spores et souligne la variété du type de fibres. Trente-deux espèces sont ainsi présentées, parmi lesquelles treize sont nouvelles ; six espèces peuvent être récoltées en France, dont une nouvelle : *S. mediterraneense*. Enfin, dans une discussion, les auteurs montrent que les caractères morphologiques et culturaux permettent de reconnaître quatre groupes d'espèces dans le genre et présentent un tableau résumant les caractéristiques mycéliennes observées.

Cette étude très complète et détaillée était attendue par tous les mycologues s'intéressant à l'étude de ces difficiles Aphyllophorales. Nul doute qu'ils trouvent dans ce travail des bases très solides permettant la détermination — jusqu'ici particulièrement ardue — des espèces de ce genre. Une fois encore le lecteur notera l'importance accordée par les auteurs aux sporées et cultures qui permettent de faire appel au critère d'intercompatibilité chez les espèces hétérothalles bouclées ou non. Ainsi par exemple, est affirmée objectivement l'identité des spécimens indonésiens et africains de *S. renisporum*, espèce dépourvue de boucles. Citons également le cas de *S. galactinum* pour lequel les résultats des tests particulièrement nombreux (résumés en deux tableaux) conduisent à reconnaître l'existence de quatre espèces jumelles allopatriques de microscopie semblable. Un résumé de l'ensemble de l'ouvrage ainsi qu'une clé des espèces, rédigés en anglais, permettront aux lecteurs anglophones une utilisation aisée de ce livre. Signalons pour terminer que l'abondance d'espèces originaires d'Afrique et de Guadeloupe n'est due qu'aux circonstances ayant permis des missions mycologiques dans ces régions et que de nombreuses espèces restent probablement à découvrir.

J.C. Léger

VÉGH I., 1987 — Champignons des arbres et arbustes d'ornement. Paris, INRA, 121 p.

Cet atlas, de petit format et présenté en reliure spirale, est constitué d'une brève introduction (2 p.), de la liste des champignons recensés suivant l'ordre alphabétique des hôtes (51 p.), de planches photographiques montrant les symptômes de quelques maladies répandues (58 p.) et enfin d'un index des essences citées sous leur nom latin ou français (3 p.)

On regrette la trop petite taille de certaines photographies ne fournissant pas une illustration correcte, et ne permettant pas une éventuelle détermination des maladies de nos arbres et arbustes d'ornement.

Le quatrième Congrès Mycologique International (IMC IV), organisé par l'Association Mycologique Internationale (IMA) se tiendra à l'Université de Regensbourg, République Fédérale Allemande, du 28 août au 3 septembre 1990 (prof. J. Webster, président IMA, Dpt of Biological Sciences, Univ. Exeter, Prince of Wales Road, Exeter EX4 4PS, Angleterre).

The fourth International Mycological Congress (IMC IV) of the International Mycological Association (IMA) will be held at the University of Regensburg, Federal Republic of Germany, from 28 August to 3 September 1990 (Prof. J. Webster, President IMA, Dpt of Biological Sciences, Univ. Exeter, Prince of Wales Road, Exeter EX4 4PS, U.K.)

TABLE DU TOME 8 — 1987

ABDEL-HAFEZ A.I.I. and EL-SHAROUNY H.M.M. — Seasonal fluctuations of fungi in Egyptian soil receiving city sewage effluents 235

ABDEL-HAFEZ A.I.I., MOHARRAM A.M.M. and ABDEL-MALLEK A.Y. — Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of *Umbelliferae* from Egypt 315

ABDEL-MALLEK A.Y. — Voir ABDEL-HAFEZ A.I.I.

ADISA V.A. and OLA J.B. — Effects of two fungicides and three environmental factors on the uredospore germination of *Puccinia arachidis* Speg. 23

ALI M.I.A. — Voir ISMAIL I.M.K.

ASCASO C. and RAPSCH S. — Influence of prefixation in the study of the structure of symbionts of *Lobaria* spp. 13

BEHBOUDI B.Ch. EBRAHIMZADEH H. et HADATCHI G. — Contrôle de la formation des rhizomorphes d'*Armillariella mellea* (Vahl. ex Fr.) Karst. par l'alternative nitrate-ammonium et certains acides aminés 227

BELLEMÈRE A. — Voir MELENDEZ-HOWELL L.M.

BETTUCCI L. — Variation saisonnière de l'activité colonisatrice de Basidiomycètes sur bois enterrés dans trois sols volcaniques 79

BUENDIA A.G[a]. — Voir ORTEGA A.

CAILLEUX R. et JOLY P. — Étude de quelques stations italiennes de *Pleurotus eryngii* : progression mycélienne et structure des populations 101

DESCALS E. — Voir ROLDAN A.

EBRAHIMZADEH H. — Voir BEHBOUBI B.Ch.

EL-SHAROUNY H.M.M. — Voir ABDEL-HAFEZ A.I.I.

HADATCHI G. — Voir BEHBOUDI B.Ch.

HENNI J.E. — Evaluation de l'efficacité de certains champignons antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae* Klebahn 203

KEYKOOP M. — Voir MORENO G.

HONRUBIA M. — Voir ROLDAN A.

ILLANA C. — Voir MORENO G.

ISMAIL I.M.K., SALAMA A.-A.M., ALI M.I.A. and OUF S.A.-E. — Effect of some phenolic compounds on spore germination and germ-tube length of *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 51

JOLY P. — Voir CAILLEUX R.

KULIFAJ M. — Voir PARGUEY-LEDUC A.

LAJOLO L. — Voir MODENESI P.

LE PICARD D., TIRILLY Y. et TRIQUE B. — Antagonistes et hyperparasites du *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri. Interactions mycéliennes avec les champignons colonisant les taches de cladosporiose de la tomate 43

MELENDEZ-HOWELL L.M., BELLEMÈRE A. et ROSSIGNOL J.-L. — Remarques à propos de l'ultrastructure d'ascospores « albinos » ou « granuleuses » de mutants d'*Ascobolus immersus* Pers. (gène b8) 269

MERCÉ J. — Hyphomycètes aquatiques. Etude des variations saisonnières d'une population ... 1

MODENESI P. and LAJOLO L. — Histochemistry of cytoplasmic reserves in excipular hyphae of *Catillaria bouteillei* (Desm.) Zalhbr. ... 33

MOHARRAM A.M.M. — Voir ABDEL-HAFEZ A.I.I.

MONTANT C. — Voir PARGUEY-LEDUC A.

MORENO G., ILLANA C. and HEYKOOP M. — *Gastrocybe iberica* sp. nov. in Spain (Bolbitiaceae, Agaricales) ... 321

MOUCHACCA J. — Quelques Micromycètes intéressants observés sur des feuilles vivantes ou mortes de *Carpinus betulus* L. ... 141

NAJIM L. — Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* : I — Études physiologiques ... 209

NAJIM L. — Contrôle morphogénétique de la différenciation des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* : II — Études cytologiques et ultrastructurales ... 289

OLA J.B. — Voir ADISA V.A.

ORTEGA A. y BUENDIA A.Gª. — Contribución al estudio de la tribu *Aleurieae* Seaver emend. Korf en la Peninsula Ibérica ... 125

OUF S.A.-E. — Voir ISMAIL I.M.K.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M. — Morphologie et structure de l'ascocarpe adulte du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes) ... 173

RAPSCH S. — Voir ASCASO C.

REYNOLDS R. Don — A nonbitunicate ascus in the ascostromatic genus *Asterina* 251

ROLDAN A., DESCALS E. y HONRUBIA M. — Notas sobre hifomicetos acuáticos saprófitos en restos vegetales ... 61

ROLDAN A., DESCALS E. y HONRUBIA M. — Notes on *Tetracladium apiense* Sinclair and Eicker ... 219

ROSSIGNOL J.-L. — Voir MELENDEZ-HOWELL L.M.

SALAMA A.-A.M. — Voir ISMAIL I.M.K.

TIRILLY Y. — Voir LE PICARD D.

TORRENTE-PAÑOS P. — Documentos para la caracterizacion de los ascos del género *Opegrapha* Ach. ... 159

TRIQUE B. — Voir LE PICARD D.

Analyses bibliographiques ... 67, 167, 329

Instructions aux auteurs ... 77

Commission paritaire nº 58611
Dépôt légal nº 13628 - Imprimerie de Montligeon
Sortie des presses le 20 décembre 1987
Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : A. Couté; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : R. Baudoin; Directeur de la publication : H. Causse

CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

Les manuscrits doivent être adressés (en 3 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Chaque membre du Bureau se charge d'envoyer l'article à 2 membres du Comité de Lecture (ou autres lecteurs compétants).

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.



ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE

Tome 9, 1988

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : ALGOLOGIE, BRYOLOGIE-LICHÉNOLOGIE, MYCOLOGIE. On peut souscrire indépendamment [redacted] chacune des sections.

Abonnement à 1 section :

France	(HT 305 F) 317,20 F
Étranger	HT 335,00 F

Abonnement aux 3 sections :

France	(HT 870 F) 904,80 F
Étranger	HT 950,00 F

Les anciens tomes et fascicules séparés de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE sont toujours disponibles.

MÉMOIRES HORS SÉRIE

Nº 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. [redacted] pages : 15 F.

Nº 3 (1943). **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

Nº 6 (1958). **Essai biotaxonomique [redacted] les Hydnés résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.

Nº 7 (1959). **Les champignons et** [redacted] (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

Nº 8 (1966). **Catalogue de la Mycothèque** de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (1) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

Nº 9 (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 20 F. — (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES

publiée [redacted] la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941). 164 pages, 46 fig. : 90 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, 88 fig. : 90 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar , par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 150 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements :

— par virement postal au nom de A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE 12, rue Buffon, 75005 Paris, C.C.P. SCE 34 764 05S.

— par chèque bancaire établi au même ordre.

